

Aus der I. Inneren Abteilung
des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. K. Holldack
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF,
Assoziation mit EURATOM, München
Leiter: Priv. Doz. Dr. St. Thierfelder

DIE WIRKUNG VON ACTINOMYCIN D AUF DIE PROLIFERATION
VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Jürgen Steinmeyer

aus Walsrode

1973

Aus der I. Inneren Abteilung
des Städt. Krankenhauses Berlin-Neukölln
Ärztlicher Direktor: Professor. Dr. med. K. Hollidack
und
aus dem Institut für Haematologie der GSF,
Assoziation mit EURATOM, München
Leiter: Priv. Doz. Dr. St. Thierfelder

DIE WIRKUNG VON ACTINOMYCIN D AUF DIE PROLIFERATION
VON MENSCHLICHEM KNOCHENMARK IN VITRO

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Jürgen Steinmeyer
aus Walsrode

Referent: Frau Professor Dr. I. Boll

Korreferent: Professor Dr. H. Brücher



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 22. 10. 1973

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG	1
II. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	2
III. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	3
IV. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	4
V. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	5
VI. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	6
VII. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	7
VIII. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	8
IX. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	9
X. DIE GEGENSTÄNDLICHE WELT	10

MEINEN ELTERN



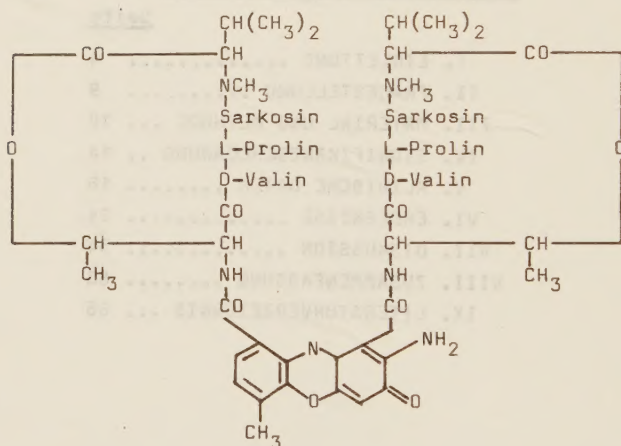
Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
I. EINLEITUNG	4
II. FRAGESTELLUNG	9
III. MATERIAL UND METHODE ...	10
IV. SIGNIFIKANZBERECHNUNG ..	14
V. KLINISCHE DATEN	18
VI. ERGEBNISSE	24
VII. DISKUSSION	54
VIII. ZUSAMMENFASSUNG	63
IX. LITERATURVERZEICHNIS ...	65

Einleitung

Die Actinomycine sind eine Gruppe von Antibiotika, die aus verschiedenen Streptomycesarten gewonnen werden. Actinomycin D ist der Hauptbestandteil des Actinomycingemisches, das Streptomyces parvullus an das Kulturmedium abgibt. Die Strukturformel des Actinomycin D läßt sich folgendermaßen wiedergeben (40):



Actinomycin D

Chemisch handelt es sich bei allen Actinomycinen um Chromopeptide. Das Chromophor, nämlich Actinomycin, ist bei allen Actinomycinen gleich aufgebaut. Die Klassifizierung der bis heute bekannten 18 verschiedenen Actinomycine erfolgt nach dem unterschiedlichen Aminosäuregehalt der Peptidseitenketten (40). Das von der pharmazeutischen Firma Sharp und Dohme auf den Markt gebrachte Zytostatikum Cosmegen^R, welches hier verwendet wurde, ist eine im wesentlichen reine Substanz von Actinomycin D und enthält

als Verunreinigung nur geringe Mengen anderer Actinomycine.

Die Actinomycine vermögen eine Hemmwirkung auf das Wachstum gramnegativer und grampositiver Bakterien sowie einiger Pilze auszuüben. Weil die Actinomycine (einschließlich Actinomycin D) zu zelltoxisch im Vergleich zu ihrer antibakteriellen Wirkung sind, ist eine Anwendung bei Infektionskrankheiten nicht möglich.

Dieser zytotoxische Effekt von Actinomycin D wird heute bei der Behandlung von neoplastischen Prozessen ausgenutzt. Meistens wird das Zytostatikum in Kombination mit Operation und Röntgenbestrahlung angewendet. Actinomycin D hat dabei eine additive Wirkung zur Strahlenbehandlung (31). Das Antibiotikum hat sich in vivo als zytostatisch wirksam gegenüber einer Reihe menschlicher Malignome erwiesen. Am besten eignet es sich zur Behandlung des Wilms-tumors, wo es, kombiniert mit Operation und Bestrahlung, heute das Mittel der Wahl darstellt. Nahezu 30 % der Wilmstumoren sprechen auf Actinomycin D günstig an, und es kommt zu einer Remission unterschiedlicher Dauer. Die Rückbildung des Primärtumors hinsichtlich seiner Größe und Aktivität, als auch das Verschwinden der Metastasen, kann 6 Wochen bis 5 Jahre anhalten. Früher oder später wird der Tumor aber resistent gegen das Zytostatikum (11,31). Andere Neoplasmen, wie das Rhabdomyosarkom, Neoplasmen des Uterus und des Hodens, die Lymphogranulomatose und das Ewing-Sarkom, wurden in einem geringeren Prozentsatz der Fälle günstig beeinflusst. Bei Malignomen des Magen-Darmtraktes sowie beim Mammakrebs und dem Lungenkarzinom fielen die Behandlungserfolge mit Actinomycin D weit weniger günstig aus. Die Dosierung beträgt 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ /die 5 Tage lang. Da sich Nebenwirkungen eventuell erst später einstellen können, muß eine Behandlungspause von mindestens 14 Tagen eingelegt werden (40).

Hämatologische Nebenwirkungen stellen sich bei der Behandlung mit Actinomycin D in der Hälfte der Fälle ein. Sowohl

die Leukozyten als auch die Thrombozyten können abfallen; mitunter kann auch einem initialen Anstieg ein Abfall folgen. Selten entwickelt sich eine normochrome Anämie (11,31). In Grad und Kombination sind die hämatologischen Nebenwirkungen individuell sehr variabel. Im Differentialblutbild entsteht in der Regel eine Lymphopenie, Neutrophilie und eine Linksverschiebung, manchmal auch eine Eosinophilie (11). Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß die Chemotherapie in der Regel kombiniert mit einer Röntgenbestrahlung erfolgt. Röntgenstrahlen sind aber ebenfalls nicht ohne Einfluß auf das hämopoetische System (7).

Auch in vitro wurde in Gewebekulturen vom Menschen und einer Reihe von Tieren die zytostatische Aktivität des Actinomycin D unter Beweis gestellt. So beschrieben Rabes und Jantsch (34) bei einer Pleurametastase eines menschlichen Nephroblastoms ab Konzentrationen von 0,015 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D bei 20 Stunden Inkubationsdauer eine deutliche Hemmung der RNS- und DNS-Synthese, die mit zunehmender Konzentration noch stärker wurde. Die Mitoseaktivität sank dabei stark ab. Goessens und Bassleer (17) stellten bei HeLa-Zellen des menschlichen Zervixkarzinoms und Fibroblasten von Hühnerembryonen eine Hemmung der Proliferation fest, wenn die Konzentration von Actinomycin D im Kulturmedium höher als 0,025 $\mu\text{g/ml}$ war. Lasnitzki (24,25) fand bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D in der Kultur eine Verschmälerung des Prostataepithels von Ratten. Auch eine Reihe anderer Autoren (1,3,13,17,25,30,38,44) konnte an menschlichen und tierischen Zellen der verschiedensten Gewebe bei Konzentrationen von ca. 0,005 bis 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D einen von der Konzentration abhängigen, verschieden stark ausgeprägten zytostatischen Effekt nachweisen. Neben der Konzentration von Actinomycin D im Kulturmedium war die Länge der Inkubationszeit entscheidend (3,17). Setzte man die Zellen nach Inkubation mit Actinomycin D in ein frisches Nährmedium, so war der zytostatische Effekt voll

reversibel, wenn die Actinomycin D-Konzentration im Kulturmedium nicht zu hoch und die Inkubationszeit nicht zu lang gewesen war (17).

Die mikroskopisch und elektronenoptisch sichtbaren Schädigungen der Zellorganellen durch Actinomycin D sind ebenso reversibel. Diese Schädigung betrifft besonders die Nukleolen. Diese werden sehr klein und dicht, wobei ihr Trockengewicht abnimmt (17). Durch die darauf folgende Fragmentation des Nukleolus kann der Zellkern einen granulo-filamentösen Anblick bieten (1). Das endoplasmatische Retikulum wird vakuolisiert. Die Polysomen können auseinanderfallen oder sogar verschwinden (1).

Biochemisch entspricht der Nukleolen- und Polysomenveränderung unter der Einwirkung des Antibiotikums eine Hemmung der RNS-Synthese. Dieser Effekt wurde autoradiographisch mit radioaktiv markiertem C^{14} -Uridin an Zellen der verschiedensten Art und Herkunft nachgewiesen (11,16,22,34,36,37,38,39,42,43 u.a.). Als biochemischer Wirkungsmechanismus für die Hemmung der RNS-Synthese durch Actinomycin D wird die Bildung von Komplexen mit der DNS durch Anlagerung des Zytostatikums an die Guaninreste der DNS diskutiert (16). Dadurch wird die von der DNS abhängige RNS-Synthese gehemmt. Die Hemmung der Proteinsynthese durch Actinomycin D setzt ca. 1 Stunde nach Blockierung der RNS-Synthese ein. Die der RNS-Hemmung nachfolgende Abnahme der Proteinsynthese sowie die unveränderte Aktivität der Enzyme der Proteinsynthese unter Actinomycin D-Einwirkung führt zu der allgemein akzeptierten Deutung, daß Actinomycin D die Proteinsynthese indirekt über die Hemmung der RNS-Synthese blockiert.

Actinomycin D führt zu einer Abnahme der Mitosehäufigkeit, wofür in der Literatur neben einer DNS-Syntheseverminderung auch andere Faktoren, besonders die Hemmung der RNS-Synthese, angeführt werden. So fand Rothstein (38) eine fast völlig gestoppte H^3 -Thymidinaufnahme und somit Hemmung der DNS-Synthese, wenn das Linsenepithel von Ochsen-

fröschen 4 Stunden einer Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D ausgesetzt war. Da andererseits die Zellteilung auch weitgehend blockiert war, wenn Actinomycin D nach der DNS-Synthesephase zugefügt worden war, schließt er, daß neben der gehemmten DNS-Synthese die blockierte RNS-Synthese für die Mitosehemmung von Bedeutung sein muß. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt Cleffmann (9), der bei einer Actinomycin D-Konzentration von $0,4 \mu\text{g/ml}$ bei *Tetrahymena pyriformis* eine normale Verdoppelung der DNS erhielt. Da die Zellteilung trotzdem inhibiert war, sieht er in der RNS-Synthesehemmung den entscheidenden Faktor für die Abnahme der Mitosehäufigkeit unter der Einwirkung des Zytostatikums.

Nach neueren Untersuchungen hemmt Actinomycin D nicht nur den Eintritt, sondern auch den Ablauf der Mitose. Es kommt durch das Zytostatikum bei Fibroblasten von Hühnern und Ratten zu einer Verlängerung der Metaphasen und die Trennung der Tochterzelle in der Telophase wird oft verhindert. (1). Mittermayr (28) fand, daß Actinomycin D bei HeLa-Zellen nach 17 Stunden Einwirkung zu einer Vermehrung der Prophasen führt. Ferner können mikroskopisch sichtbar die Chromosomen kondensieren oder atypische Teilungsfiguren auftreten (1,17).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß Actinomycin D seine Zytostatische und zytotoxische Eigenschaft in vivo und in vitro an einer großen Zahl von Zellarten beim Menschen und einer Reihe von Tieren unter Beweis gestellt hat. Die Ursache dafür ist eine Hemmung der RNS-, DNS- und Proteinsynthese. Denselben Effekt von Actinomycin D wies Torelli (43) in vitro Versuchen auch für menschliches Knochenmark nach, ohne allerdings wie wir die Zellzusammensetzung des Knochenmarks unter Einwirkung des Zytostatikums zu untersuchen.

Fragestellung

Bei der Chemotherapie menschlicher Malignome mit Actinomycin D treten hämatologische Nebenwirkungen auf, die von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sind. Es lag nahe, diese hämatologischen Veränderungen, deren Ursache im wesentlichen eine Beeinflussung der Knochenmarkzellen durch das Zytostatikum sein dürfte, in vitro durch direkte Einwirkung des Actinomycin D auf menschliches Knochenmark näher zu untersuchen. In einer früheren Untersuchung war nach der gleichen Methode die Wirkung von Actinomycin C auf die Proliferation von menschlichem Knochenmark in vitro untersucht worden (46). Da Actinomycin D einerseits in Untersuchungen anderer Autoren (2,16,21,22,29,36,43) eine Beeinflussung von Knochenmarkzellen zeigt, andererseits die Gruppe der Actinomycine einen ähnlichen biochemischen Wirkungsmechanismus besitzen soll (40), sollte in dieser Arbeit die Wirkung des Actinomycin D mit der des Actinomycin C unter gleichen Versuchsbedingungen verglichen werden.

Material und Methode

Durch Sternalpunktion wurde menschliches Knochenmark gewonnen und nach der Carell'schen Methode, modifiziert nach Boll, (4) kultiviert. Dazu wurde das Nativplasma mit dem Wuchsstoff Corhormon^R und Hank'scher Lösung vermischt, so daß eine koagulierte Mischung entstand, die zu 10 % dreifach verstärktes Corhormon^R und zu 40 % Hank'sche Lösung enthielt. Je ein Tropfen davon wurde auf einen Objektträger gebracht, auf dieses Koagel ein Knochenmarkbröckel gesetzt und mit Serum bedeckt. Durch Anwendung von hohlgeschliffenen Objektträgern sowie Einbettung in Paraffin, wurde die Kultur luftdicht verschlossen und als hängender Tropfen bei 37° C in den Brutschrank gelegt. Es wurde das Knochenmark von 6 Patienten untersucht.

Neben Kontrollkulturen, die nur die oben aufgeführten Bestandteile enthielten, wurden zu 3 Kulturserien 0,5 / μ g/ml Actinomycin D^x, zu weiteren 3 Kulturserien 0,05 / μ g/ml Actinomycin D hinzugefügt.

Nach 24, 48, 72 und, soweit noch verwertbar, nach 96 Stunden wurde aus der jeweiligen Kultur ein Teil entnommen und durch Anfertigung der nach Pappenheim gefärbten Ausstriche die Zusammensetzung der Kultur zu diesen Zeiten ermittelt. Außerdem wurden von dem bei der Sternalpunktion gewonnenen Knochenmark direkt Ausstriche angefertigt. Die Beurteilung erfolgte durch mäanderförmiges Auszählen am Rand der Ausstriche, wobei bei Fall Nr. 3 1000 Zellen, bei den übrigen 5 Patienten je 2000 Zellen zu jeder Stichprobe ausgezählt wurden. Die Differenzierung der Zellen erfolgte nach den von Boll und Mersch (5,6) angegebenen Kriterien. Hinter den nach diesen Kriterien unterteilbaren Zellarten stehen in Klammern die in den Tabellen und Abbildungen dieser Arbeit gebrauchten Abkürzungen.

^x Cosmegen^R der Firma Sharp and Dohme GmbH

Erythropoese:

- | | |
|-----------------------------------|------|
| 1. Proerythroblast | (Pe) |
| 2. basophiler Erythroblast | (bE) |
| 3. polychromatischer Erythroblast | (pE) |
| 4. oxyphiler Erythroblast | (oE) |
| 5. reifer Erythroblast | (rE) |

Die Zellen 1 - 4 wurden als teilungsfähig angenommen.

Granulopoese:

- | | |
|---|-------|
| 1. Myeloblast | (Mb) |
| 2. Promyelozyt | (P) |
| 3. neutrophiler Myelozyt | (nM) |
| 4. eosinophiler Myelozyt | (eM) |
| 5. basophiler Myelozyt | (bM) |
| 6. Promonozyt | (Pmo) |
| 7. jugendlicher Myelozyt | (Jg) |
| 8. stabkerniger Granulozyt | (St) |
| 9. neutrophiler segmentkerniger Granulozyt | (nS) |
| 10. eosinophiler segmentkerniger Granulozyt | (eS) |
| 11. basophiler segmentkerniger Granulozyt | (bS) |
| 12. Monozyt | (Mo) |

Die Zellen 1 - 7 wurden als teilungsfähig angenommen.

Neben den Zellen der Erythro- und Granulopoese wurden noch folgende Zellen gezählt:

große Retikulumzellen
 kleine Retikulumzellen
 phagozytierende Retikulumzellen
 Plasmoblasten
 Plasmazellen
 Megakaryozyten
 Megakaryoblasten
 Lymphoblasten
 Lymphozyten

Wurde bei der Auszählung eine Zelle in Mitose angetroffen, so wurde die Mitosephase nach Boll (6) differenziert in:

1. Prophase:
Kernmembran aufgelöst, keine Nukleoli, festes Spirem.
2. Frühe Metaphase:
Lockerer Spirem, Chromosomen über die ganze Zelle verteilt.
3. Späte Metaphase: Monaster
4. Anaphase: Diaster
5. Telophase:
Lockerer Dispirem, Zellplasma eingeschnürt.
6. Rekonstruktionsphase:
Zwei Zellen mit festem Dispirem.

Die ausgezählten Präparate wurden ausgewertet wie folgt:

1. Anfertigung von Reifungskurven der Erythropoese und der Granulopoese, indem die Kulturzeit gegen die prozentuale Zusammensetzung in den beiden Zellreihen aufgetragen wurde.
2. Berechnung des G/E-Indexes, der über das Zellzahlverhältnis von Granulopoese zu Erythropoese aussagt.
3. Berechnung des Mitoseindexes getrennt für die Erythropoese und die Granulopoese, indem die Zahl der sich in Mitose befindlichen Zellen durch die Zahl der teilungsfähigen dividiert wurde.
4. Anfertigung der karyologischen Kurven. Wegen der geringen Zahl der Mitosen wurden dabei zusammen alle Mitosen, die in der Versuchskonzentrationen 0,5 und 0,05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Actinomycin D aufgetreten waren, den Mitosephasen in allen Kontrollkuren gegenübergestellt.

Um Gemeinsamkeiten der 3 Versuchsansätze unter 0,5 $\mu\text{g/ml}$ und der 3 unter 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D gegenüber den Kontrollen besser zu erfassen, wurden durch Addition der einzelnen Zellklassen bzw. der darin vorkommenden Mitosen die gemittelten Reifungskurven, die G/E-Indices sowie die roten und weißen Mitoseindices der Fälle 1-3 (0,5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D als Zusatz) bzw. 4-6 (0,05 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D als Zusatz) erhalten.

Signifikanzberechnung

Es sollte mit mathematisch-statistischen Methoden entschieden werden, ob Unterschiede zwischen den Kontrollkulturen und den Kulturen mit Cosmegenzusatz statistisch signifikant oder zufällig vorhanden sind. Dazu wurde die 0-Hypothese, die besagt, daß sich 2 Stichproben wahrscheinlich nicht voneinander unterscheiden, bzw. die Differenz zwischen 2 Stichproben 0 ist, statistisch mit der größten Wahrscheinlichkeit widerlegt. Hierfür wurde das im Folgenden beschriebene χ^2 -Verfahren für die rote und weiße Reihe getrennt angewendet. Die Wahrscheinlichkeit wurde in Werten zwischen $p = 0$ und $p = 1$ ausgedrückt. Dabei bedeuten die kleinsten p -Werte die größte Wahrscheinlichkeit für die Widerlegung der 0-Hypothese. Die in der Arbeit angegebenen signifikanten Unterschiede liegen unter $p = 0,05$; also unterscheiden sich die geprüften Werte mit mehr als 95 % Wahrscheinlichkeit.

Die Berechnung der χ^2 -Werte erfolgte nach folgender Formel:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(B_k - E_k)^2}{E_k} \right] + \sum \left[\frac{(B_c - E_c)^2}{E_c} \right]$$

Dabei bedeuten $\sum$ = Summe der einzelnen innerhalb der Klammer berechneten Werte, B_k = Beobachtungswert in der Kontrollkultur, B_c = Beobachtungswert in der entsprechenden Kultur mit Cosmogen^R-Zusatz, E_k = Erwartungswert von B_k , E_c = Erwartungswert von B_c .

Die Berechnung soll an einem Beispiel erläutert werden:

Patient T. G. 24-Stunden-Kultur, 0,5 µg/ml Actinomycin D als Zusatz (C) bzw. Kontrollgruppe ohne Zusatz, rote Reihe:

	K	C
Pe	51	9
bE	56	12
pE	289	174
oE	68	58
rE	46	86
Teil summe	510	339

Die beiden Stichproben werden summiert, wodurch sich folgende Reihe ergibt:

Pe	51 + 9 =	60
bE		68
pE		463
oE		126
rE		132
	849 =	Summe der vereinigten Stichproben

Jetzt werden Prozentzahlen bzw. p-Werte gebildet:

60 = 7,07 % von 849.

60 = 7,071 %, p =	0,0707
68	0,0801
463	0,5453
126	0,1484
132	0,1555
849	1,0000

Es folgt die Errechnung der Erwartungswerte getrennt für die Kontrollgruppe und die mit Actinomycin D behandelte Gruppe. (z. B. Erwartungswert von Pb_k = neue p-Zahl der vereinigten Stichproben $0,07071 \times$ Teilsumme der Kontrolle $510 = 36,0424$.) Es ergeben sich dann folgende Reihen:

E_k : 36,0424	E_c : 23,9576
40,8481	27,1519
278,1272	184,8728
75,6890	50,3110
79,2933	52,7067

Die Beobachtungswerte werden jetzt einzeln mit den Erwartungswerten nach der oben angegebenen Formel verglichen.

$$\frac{(B_k - E_k)}{E_k}, \text{ für } P_{B_k}: \frac{(51 - 36,0424)^2}{36,0424} = 6,2074$$

Dadurch bilden sich für die K- und C-Gruppe je eine Reihe, deren Summen addiert χ^2 ergibt.

K: 6,2074	C: 9,3386
5,6204	8,4554
0,4250	0,6395
0,7811	1,1751
<u>13,9790</u>	<u>21,0304</u>
= 27,0129	+ 40,6390 = 67,6519

Zu diesem χ^2 -Wert kann man jetzt in den von Fisher und Yates (13) konstruierten graphischen Tafeln bei dem entsprechenden Freiheitsgrad das p bestimmen. Bei diesem Beispiel ist bei 5 Klassen der Freiheitsgrad $5 - 1 = 4$. Das zu dem oben errechneten χ^2 -Wert errechnete p ist noch sehr viel kleiner als 0,01. In diesem Fall ist also die 0-Hypothese mit sehr großer Wahrscheinlichkeit widerlegt worden.

Die oben angewendete Methode der Berechnung ist nur anwendbar bei Erwartungswerten, die größer als 5 sind. Sonst wurde die Yate'sche Korrektur verwendet. Dabei wird der Beobachtungswert um 0,5 erhöht bei Erwartungswerten, die größer als 5 sind. Die Yate'sche Korrektur wurde bei der Signifikanzberechnung der Mitoseindizes angewendet.

In der folgenden Tabelle wurde angegeben, welchen Wert χ^2 in diesen Untersuchungen bei entsprechenden Freiheitsgraden überschreiten mußte, damit der Unterschied mit 95 % Wahrscheinlichkeit (= signifikant) oder mit 99 % Wahrscheinlichkeit (= hochsignifikant) gesichert werden konnte.

In den Tabellen wurden signifikante Unterschiede durch +, hochsignifikante durch ++ kenntlich gemacht.

Freiheitsgrade	95 %	99 %
2	6,0	9,1
3	7,8	11,4
4	9,5	13,3
7	14,1	18,5
8	15,4	20,1
9	17,9	21,7
10	18,3	23,2
11	19,7	24,7

Für die gezeichneten Kurven gelten folgende Markierungen:

—————	Kontrollkultur
-----	Zusatz 0,5 μ g/ml Actinomycin D
.....	Zusatz 0,05 μ g/ml Actinomycin D

In den Reifungskurven werden der G/E-Index sowie der rote und weiße Mitoseindex nach den verschiedenen Bebrütungszeiten aufgeführt. Ein auf die Kontrollkultur sich beziehender Zahlenwert steht ohne Klammern, ein für die Kultur mit Actinomycin-D-Zusatz gültiger Wert dagegen in Klammern.

In den Tabellen sind Zahlenwerte, die in der Kontrollkultur erhalten wurden mit K, solche, die sich auf die Kultur mit Actinomycin D als Zusatz beziehen, mit C (C = Cosmegen^R) kenntlich gemacht.

Klinische Daten

Im Folgenden werden die für diese Arbeit wichtigen klinischen Daten der 6 Patienten, deren Knochenmark in vitro untersucht wurde, kurz aufgeführt.

Fall 1:

Pat. T. G., geb. am 6. 6. 1905

Diagnose: Altersdiabetes, Adenokarzinom des Magentrums, Eisenmangelanämie.

Sternalpunktion: am 4. 1. 1971

Knochenmarkdiagnose: Angeregte Erythropoese wie bei Eisenmangelanämie und Retikulumzellvermehrung, wie sie bei einem chronischen, entzündlichen Prozeß oder Tumor vorkommt.

Therapie bis zur Sternalpunktion: Täglich 3 x 5 mg Valium^R und 1 Tablette Daonil^R.

Blutbild am 19. 12. 1970

Erythrozyten 3,82 Mill./mm³

Hb 9,1 g %

HbE 24,4 pg

Anisocytose ++

Poikilozytose +

Polychromasie ++

Leukozyten 6900/mm³

Eosinophile 4 %

Stabkernige 1 %

Segmentkernige 69 %

Lymphozyten 22 %

Monozyten 4 %

Fall 2:

Pat. M. F., geb. am 24. 2. 1890

Stationäre Aufnahme am 7. 2. 1971

Diagnose: Thrombophlebitis des rechten Unterschenkels,
Herzinsuffizienz, chronische Lymphadenose.

Sternalpunktion: am 15. 2. 1971

Knochenmarkdiagnose: Chronische Lymphadenose, Erythropoese und Granulopoese scheinen nicht beeinflußt zu sein.

Therapie bis zur Sternalpunktion: Täglich 2 x 1 Lanicor^R,
1 Kalinor-Brausetablette^R, 1 Dragée Cosaldon retard^R.

Blutbild: am 12. 2. 1971

Erythrozyten 3,55 Mill./mm³

Hb 10,6 g %

HbE 30 pg

Anisocytose (+)

Leukozyten 24800/mm³

Stabkernige 1 %

Segmentkernige 23 %

Lymphozyten 73 %

Monozyten 3 %

Thrombozyten 260.000/mm³

Fall 3:

Pat. I. K., geb. am 7. 5. 1943

Befindet sich seit 10 Jahren in regelmäßiger Kontrolle der hämatologischen Ambulanz.

Diagnose: Chronisch myeloische Leukämie

Sternalpunktion: am 15. 3. 1971

Knochenmarkdiagnose: Die Granulopoese ist nur gering vermehrt und etwas nach links verschoben. Mikrokaryozyten und Gaucher-Zellen kommen vor.

Therapie bis zur Sternalpunktion: 2 mg Myleran^R/Woche.

Blutbild: am 1. 4. 1971

Erythrozyten 4,33 Mill./mm³

Hb 14,3 g %

HbE 32,8 pg

Anisocytose (+)

Leukozyten 12200/mm³

Eosinophile 5 %

Basophile 6 %

Stabkernige 1 %

Segmentkernige 63 %

Monozyten 6 %

Lymphozyten 19 %

Toxische Granulierung +

Thrombozyten 231.000/mm³ (27. 10. 1971)

Fall 4:

Pat. H. L., geb. am 12. 7. 1895

Stationäre Aufnahme: am 19. 3. 1971

Diagnose: Perniciöse Anämie, chronische Pyelonephritis,
Arthrose beider Hüft- und Kniegelenke, Cere-
bralsklerose.

Sternalpunktion: am 31. 3. 1971

Knochenmarkdiagnose: Megaloblasten und Riesenstäbe
sprechen für perniciöse Anämie.

Therapie bis zur Sternalpunktion: Täglich 3 x 0,25 mg
Lanicor^R, 3 x 1 Eßlöffel Mixtura pepsini, 1 Kps. Vibra-
mycin^R, 1 Kps. Furadantin retard^R.

Blutbild: am 30. 3. 1971

Erythrozyten 2,72 Mill./mm³

Hb 10,1 g %

HbE 37,2 pg

Anisocytose ++

Poikilocytose +

Leukozyten 11700/mm³

Eosinophile 2 %

Segmentkernige 60 %

Lymphozyten 36 %

Monozyten 2 %

Fall 5:

Pat. K. E., geb. am 13. 4. 1899

Stationäre Aufnahme am 21. 6. 1970

Diagnose: Symptomatische Makroglobulinämie oder M.
Waldenström mit cerebellärer Ataxie, Pero-
näusparese links.

Sternalpunktion: am 14. 4. 1971

Knochenmarkdiagnose: Bis auf eine Vermehrung der
Plasmazellen und kleinen lympho-
iden Retikulumzellen unauffälli-
ges Knochenmark.

Therapie bis zur Sternalpunktion: Täglich 3 x 1 Eßl.

Mixtura pepsini, 20 mg Psyquil^R, 3 x 1 Rovigon^R.

Blutbild: am 22. 6. 1970

Erythrozyten 4,35 Mill./mm³

Hb 13,5 g %

HbE 31,2 pg

Leukozyten 10500/mm³

Eosinophile 2 %

Stabkernige 7 %

Segmentkernige 58 %

Lymphozyten 28 %

Monozyten 5 %

Thrombozyten 212.000/mm³

Blutsenkungsreaktion 76/115

Fall 6:

Pat. H. N., geb. am 21. 3. 1910

Stationäre Aufnahme am 10. 5. 1971

Diagnose: Chronische Pyelonephritis bei Nierenausguß-
stein rechts, Diabetes mellitus.

Sternalpunktion: am 24. 5. 1971

Knochenmarkdiagnose: Angeregte megaloblastoide Erythro-
poese. Granulopoese vermehrt. Der
Knochenmarkbefund zeigt eine Reak-
tion auf die Entzündung und die
Zeichen einer nephrogenen Anämie.

Therapie bis zur Sternalpunktion: Täglich 1 Dragée Mode-
nol^R, 2 x 1 Amp. Refobacin^R, 2 x 0,25 mg Lanicor^R.

Blutbild: am 11. 5. 1971

Erythrozyten 3,21 Mill./mm³

Hb 10,6 g %

HbE 33 pg

Leukozyten 14000/mm³

Promy 1 %

Myl 1 %

Bas 2 %

Eos 2 %

Stab 1 %

Seg 68 %

Lymph 25 %

Thrombozyten 364.000/mm³

Ergebnisse:

Den Ergebnissen dieser Arbeit liegt die Auszählung von ca. 79.000 Knochenmarkzellen in 41 Präparaten zugrunde. Morphologische Zeichen, die für eine vermehrte Schädigung der Knochenmarkzellen unter der Einwirkung von Actinomycin D sprechen würden, wie Segmentation des Zellkerns, Vakuolenbildung usw., wurden nicht auffällig gegenüber der Kontrolle gefunden. Auch verstärktes Auftreten von Zelldetritus in den Kulturen mit Actinomycin-D-Zusatz war nicht vorhanden.

Reifungskurven mit 0,5 µg/ml Actinomycin D

Fall 1: Eisenmangelanämie bei Magencarcinom, Abb. 1, S. 26, Tab. S. 25.

1. Erythropoese

Es fällt eine deutliche Linksverschiebung nach 24, 48 und 72 Stunden in den Kulturen mit Actinomycin-D-Zusatz gegenüber den Kontrollkulturen auf; d. h., die unreifen Zellen haben zugunsten der reifen Zellen abgenommen. Die statistische Berechnung ergibt zu allen drei oben genannten Zeiten hochsignifikante Unterschiede.

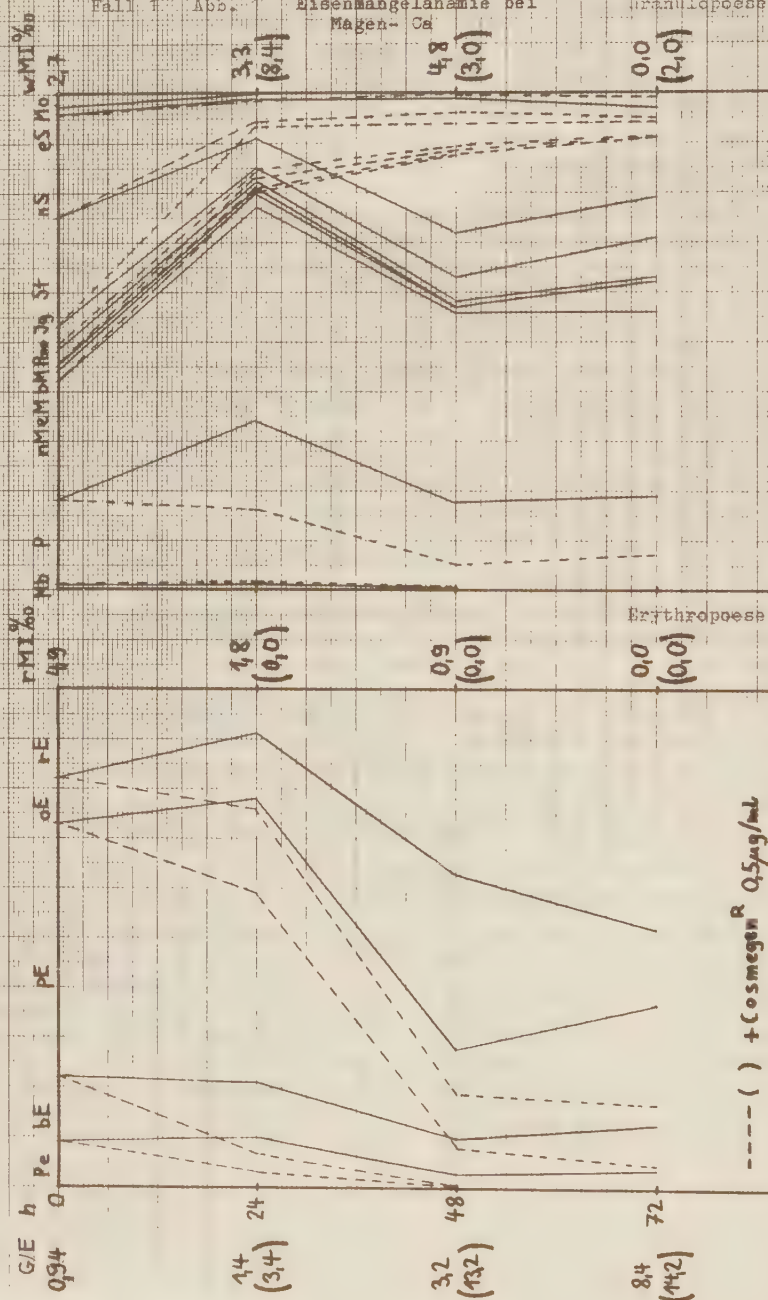
2. Granulopoese

Nach 24 Stunden findet sich in der Kultur mit Actinomycin-D-Zusatz gegenüber der Kontrollkultur eine Abnahme der Myeloblasten, Promyelozyten und Stabkernigen. Dieser Abnahme steht eine Zunahme der neutrophilen Myelozyten und Jugendlichen gegenüber. Die Reifungskurven sind dadurch gespreizt. Insgesamt haben die teilungsfähigen Zellen zugenommen. In den 48- und 72-Stunden-Kulturen ist der Effekt noch deutlicher. Abgenommen haben die Promyelozyten, die Stabkernigen und die Segmentkernigen. Stark vermehrt sind die neutrophilen Myelozyten, wodurch insgesamt also eine Zunahme der teilungsfähigen Zellen resultiert. Die in den Kulturen nach 24, 48 und 72 Stunden Bebrütung erhaltenen Unterschiede sind alle hochsignifikant.

Fall 1/Tab. 1

	24 h		48 h		72 h	
	K	C	K	C	K	C
Pe	51	9	9	0	6	0
bE	56	12	23	0	14	0
pE	289	174	59	11	36	5
oE	68	58	115	15	23	13
rE	46	86	119	107	71	92
	67,652 ⁺⁺		75,201 ⁺⁺		43,805 ⁺⁺	
Mb	9	0	4	0	0	0
P	237	180	182	80	243	109
nM	310	741	385	1446	466	1312
eM	20	39	9	19	8	33
bM	3	3	2	1	1	2
Pmo	5	12	14	1	17	7
Jq	21	104	49	94	100	49
St	43	3	94	49	97	12
nS	61	73	294	68	294	24
eS	8	9	7	6	43	14
bS	1	0	0	0	0	0
Mo	1	0	3	0	0	0
	201,666 ⁺⁺		1048,346 ⁺⁺		779,056 ⁺⁺	

	K	C
r MI	$\frac{1}{464}$	$\frac{0}{253}$
24 h		
w MI	$\frac{2}{605}$	$\frac{9}{1079}$
24 h		
r MI	$\frac{1}{206}$	$\frac{0}{26}$
48 h		
w MI	$\frac{2}{645}$	$\frac{5}{1641}$
48 h		
r MI	$\frac{0}{79}$	$\frac{0}{18}$
72 h		
w MI	$\frac{0}{835}$	$\frac{3}{1512}$
72 h		



----- () + (osmegon^R 0.5µg/ml

Kontrolle

Fall 2: Chronisch-lymphatische Leukämie, Abb. 2, S. 30,
Tab. 2 S. 29.

1. Erythropoese

Nach 48 Stunden Bebrütung haben in der Kultur mit Actinomycin-D-Zusatz gegenüber der Kontrolle die polychromatischen Erythroblasten zugenommen, die reifen Erythroblasten entsprechend abgenommen. Dieser Unterschied ist statistisch hochsignifikant, dagegen läßt sich für die 24-, 72- und 96-Stundenkultur kein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen, obgleich wie in Abb. 1 nach 24 Stunden eine deutliche Linksverschiebung der Reifungskurven stattgefunden hat.

2. Granulopoese

Nach 24 Stunden findet sich in der Kultur mit Actinomycin-D-Zusatz gegenüber den Kulturen ohne diesen Zusatz eine Abnahme der Promyelozyten, Stabkernigen und neutrophilen Segmentkernigen. Ihren Anteil erhöht haben besonders die neutrophilen, weniger die eosinophilen Myelozyten. Insgesamt ist wie in Abb. 1 eine Spreizung der Reifungskurve zu finden; die teilungsfähigen Zellen haben relativ zugenommen. Nach 48 Stunden Bebrütungs-dauer kommt es in den mit Actinomycin D behandelten Kulturen zu einer geringen Zunahme der Promyelozyten und starken Zunahme der Myelozyten, dagegen fallen die neutrophilen Segmentkernigen stark ab. Es resultiert eine sehr deutliche Rechtsverschiebung der Reifungskurven, d. h. die unreifen Zellen nehmen stark zu gegenüber der Kontrolle. In der 72-Stundenkultur nehmen die Promyelozyten, die Stabkernigen und sehr stark die neutrophilen Segmentkernigen ab. Es steigen die eosinophilen Myelozyten und sehr stark die neutrophilen Myelozyten an. Die Rechtsverschiebung der Reifungskurven nimmt gegenüber der 48-Stunden-Bebrütungs-dauer noch leicht zu. Nach 96 Stunden Bebrütungs-dauer nimmt die Rechtsver-

schiebung der Reifungskurven ab, ist aber noch immer deutlich gegenüber der Kontrolle vorhanden. Die Promyelozyten und die neutrophilen Myelozyten sind deutlich vermehrt bei gleichzeitiger Abnahme der Stabkernigen und neutrophilen Segmentkernigen. In allen 4 Kulturstufen sind die Unterschiede zwischen Kulturen mit und ohne Zusatz hochsignifikant.

3. Lymphozyten

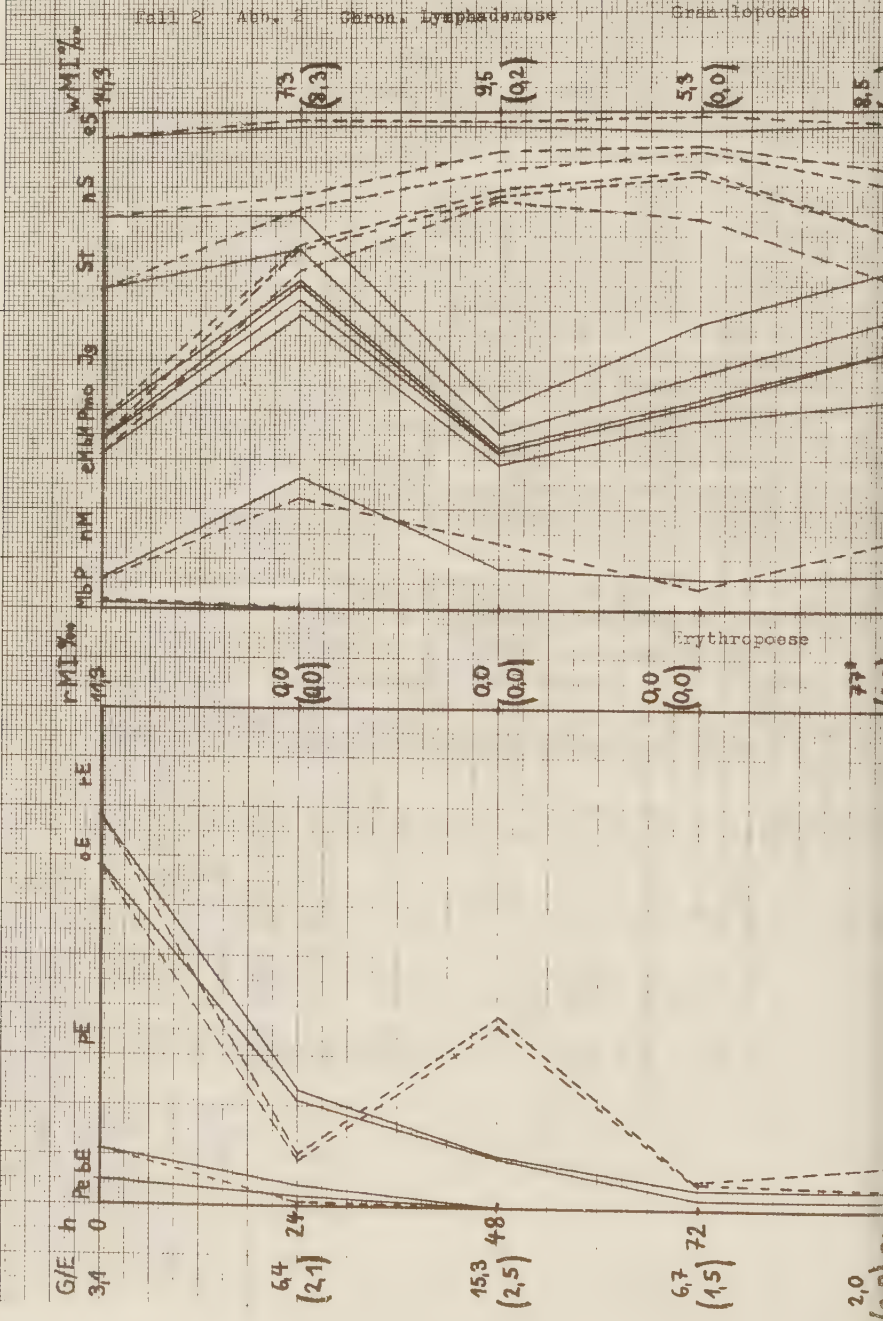
Im Original sind von 2006 gezählten Zellen 1166 Lymphozyten.

	K	C
Nach 24 Stunden Bebrütung	841/2012	944/2084
Nach 48 Stunden Bebrütung	721/2001	1072/2008
Nach 72 Stunden Bebrütung	966/2003	291/ 768
Nach 96 Stunden Bebrütung	1052/2009	1118/2003

Mit Ausnahme der 72-Stundenkultur nimmt somit der Lymphozytenanteil in den Kulturen mit Actinomycin-D-Zusatz zu. Bei der Auszählung der Präparate fällt aber eine inhomogene Verteilung der Lymphozyten auf, so daß die erhaltene Veränderung des Lymphozytenanteils unter der Einwirkung von Actinomycin D auch methodisch bedingt sein könnte.

Fall 2/Tab. 2

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	K	C	K	C	K	C	K	C
Pe	3	0	0	0	0	0	0	0
bE	3	2	0	1	1	0	0	0
pE	26	29	8	92	2	9	7	9
oE	3	2	0	6	2	0	6	12
rE	118	333	70	158	114	196	282	209
	8,354		37,193 ⁺⁺		6,797		5,134	
Mb	3	3	4	0	2	0	0	1
P	255	163	99	86	48	12	41	87
nM	322	346	251	446	257	223	214	325
eM	25	33	26	0	22	28	62	61
bM	3	1	0	0	1	0	2	0
Pmo	10	6	8	5	8	4	0	0
Jg	63	49	35	26	38	12	34	55
St	70	25	61	27	78	2	61	24
nS	188	106	653	41	315	17	169	61
eS	32	14	38	17	30	3	21	20
bS	0	2	0	0	0	0	1	0
Mo	2	2	0	0	0	0	0	0
	51,190 ⁺⁺		541,214 ⁺⁺		225,016 ⁺⁺		114,581 ⁺⁺	
	K	C			K	C		
r MI	$\frac{0}{33}$	$\frac{0}{33}$	r MI		$\frac{0}{5}$	$\frac{0}{9}$		
24 h			72 h					
w MI	$\frac{5}{681}$	$\frac{5}{605}$	w MI		$\frac{2}{376}$	$\frac{0}{279}$		
24 h			72 h					
r MI	$\frac{0}{8}$	$\frac{0}{99}$	r MI		$\frac{1}{13}$	$\frac{0}{21}$		
48 h			96 h					
w MI	$\frac{4}{423}$	$\frac{1}{563}$	w MI		$\frac{3}{353}$	$\frac{0}{529}$		
48 h			96 h					



Fall 3: Chronisch-myeloische Leukämie, Abb. 3, S. 34,
Tab. 3, S. 33 .

1. Erythropoese

Nach 24 Stunden ist es in den Kulturen mit Actinomycin-D-Zusatz zu einer Abnahme der Proerythroblasten und der reifen Erythroblasten gekommen. Die polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten haben zugenommen. Die Reifungskurve ist bei gleichzeitiger Abnahme der Proerythroblasten nach rechts verschoben. Nach 48 Stunden ist unter Actinomycin D ein Fehlen der basophilen, eine Abnahme der polychromatischen und oxyphilen, bei gleichzeitiger Zunahme der reifen Erythroblasten eingetreten. Die Zahl der unreifen Zellen ist dadurch geringer als in der Kultur ohne Actinomycin D. Es resultiert also eine Linksverschiebung der Reifungskurve. Nach 72 Stunden ist die Reifungskurve noch weiter nach links gerückt. Zu allen drei untersuchten Zeiten ergibt die statistische Berechnung hochsignifikante Unterschiede. Nach 96 Stunden kann die Zusatzkultur nicht mehr ausgezählt werden.

2. Granulopoese

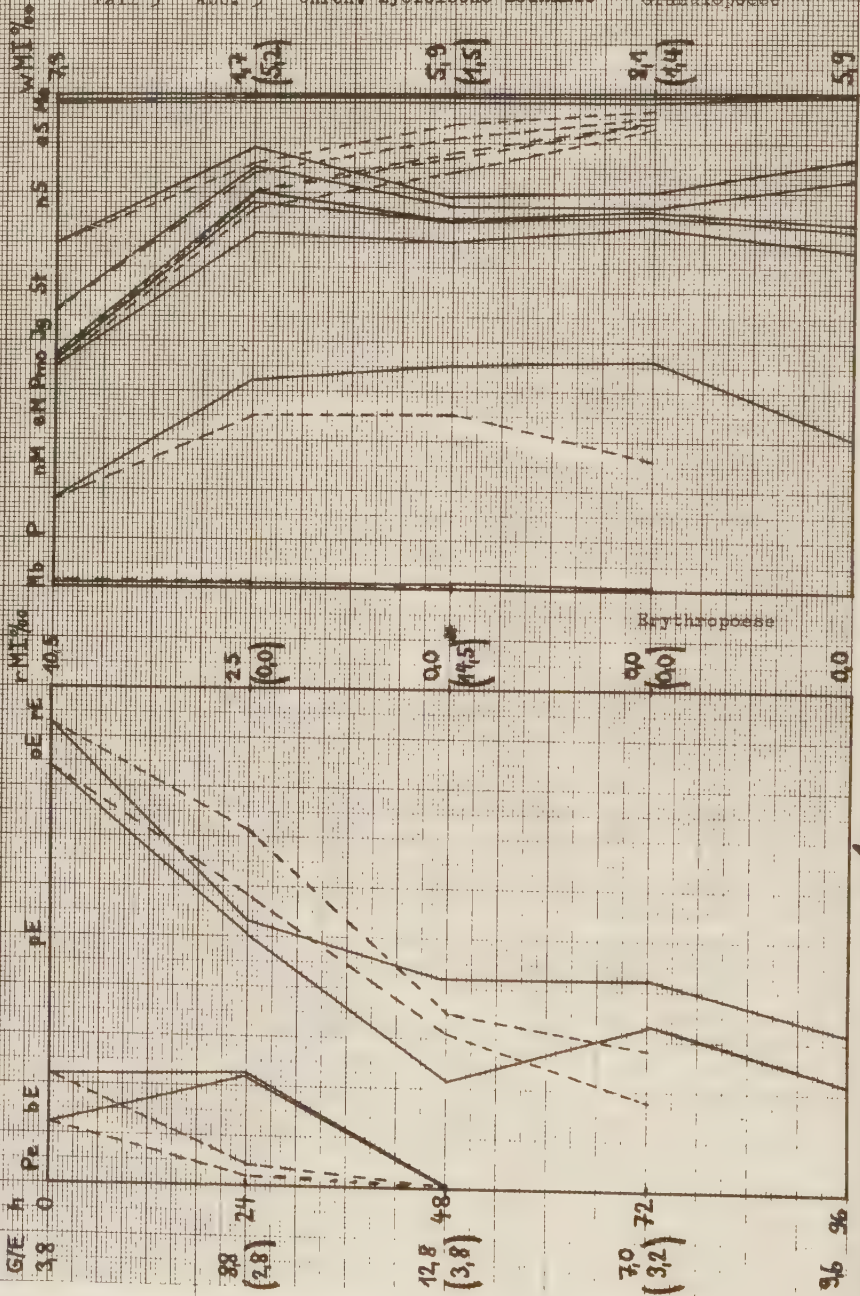
Nach 24 Stunden ist die Reifungskurve noch fast unverschoben. Es ist aber in der Kultur mit Actinomycin D gegenüber der Kultur ohne diesen Zusatz zu einer Abnahme der Promyelozyten, eosinophilen Myelozyten, Promonozyten und Stabkernigen gekommen. Stark zugenommen haben die neutrophilen Myelozyten, leicht die neutrophilen Segmentkernigen. Nach 48 Stunden ist eine weitere deutliche Spreizung der Reifungskurve eingetreten. Abgenommen haben die Myeloblasten, Promyelozyten, eosinophilen Myelozyten und eosinophilen Segmentkernigen. Die auffallendste Veränderung ist die starke Zunahme der neutrophilen Myelozyten. Weniger stark steigen die Promonozyten und die Stabkernigen an. Nach 72 Stunden ist

die Spreizung der Reifungskurve noch stärker geworden. Sie kommt zustande durch eine starke Vermehrung der neutrophilen Myelozyten und starken Abfall der neutrophilen Segmentkernigen. Weniger deutlich nehmen die Promyelozyten, Stabkernigen und eosinophilen Segmentkernigen ab. Auch in der Granulopoese ist die zu allen drei Zeiten gefundene Zusammensetzung der Kulturen mit und ohne Zusatz bei der Berechnung nach dem χ^2 -Verfahren statistisch hochsignifikant unterschiedlich.

Fall 3/Tab. 3

	24 h		48 h		72 h		96 h	
	K	C	K	C	K	C	K	C
Pe	17	5	0	0	0	0	0	
bE	0	5	0	0	0	0	0	
pE	21	133	15	62	38	41	19	
oE	2	32	14	7	10	23	9	
rE	39	74	39	132	67	169	58	
	57,702 ⁺⁺		20,968 ⁺⁺		10,518 ⁺⁺			
Mb	8	6	5	1	0	0	0	
P	285	231	387	259	368	197	258	
nM	207	290	227	378	216	501	301	
eM	39	23	34	19	14	10	29	
bM	0	0	5	4	2	0	2	
Pmo	13	0	0	4	5	3	10	
Jg	34	27	25	19	8	10	78	
St	26	13	14	30	24	9	29	
nS	73	93	163	58	155	18	107	
eS	4	5	10	0	10	0	9	
bS	0	0	0	0	0	0	2	
Mo	3	0	5	0	5	0	0	
	47,573 ⁺⁺		139,701		296,926 ⁺⁺			
	K	C			K	C		
r MI	$\frac{1}{40}$	$\frac{0}{175}$	r MI	$\frac{0}{48}$	$\frac{0}{64}$			
24 h			72 h					
w MI	$\frac{1}{586}$	$\frac{3}{577}$	w MI	$\frac{5}{613}$	$\frac{2}{721}$			
24 h			72 h					
r MI	$\frac{0}{29}$	$\frac{1}{69}$	r MI	$\frac{0}{28}$				
48 h			96 h					
w MI	$\frac{4}{683}$	$\frac{1}{684}$	w MI	$\frac{4}{678}$				
48 h			96 h					

Fall 3. Abb. 3 Chron. myelotische Leukämie Granulopoese



Reifungskurven mit 0,05 μ g/ml Actinomycin D

Fall 4: perniziöse Anämie, Abb. 4, S. 38, Tab. 4, S. 7.

1. Erythropoese

In der 24-Stundenkultur mit Actinomycin-D-Zusatz ist es zu einer Abnahme der Proerythroblasten und der polychromatischen Erythroblasten gekommen, die basophilen Erythroblasten nehmen leicht, die reifen Erythroblasten stärker zu. Zusammen ergibt sich eine deutliche Verschiebung der Reifungskurve nach links; also erfolgt in der Kultur mit Actinomycin D eine Abnahme der unreifen Zellen gegenüber der Kontrollkultur ohne Zusatz. Nach 48 Stunden ist die Reifungskurve etwa gleich weit nach links verschoben wie nach 24 Stunden. Alle vorhandenen unreifen Zellen, basophile, polychromatische und oxyphile Erythroblasten sind vermindert, die reifen Erythroblasten entsprechend vermehrt. Zu diesen beiden Zeiten ergibt die statistische Berechnung hochsignifikante Unterschiede, keine statistische Signifikanz dagegen beim Vergleich der beiden 72-Stundenkulturen.

2. Granulopoese

Nach 24 Stunden Bebrütungsdauer ist in der Kultur mit Actinomycin D eine leichte Linksverschiebung der Reifungskurve eingetreten. Abgenommen haben die Myeloblasten, Promyelozyten und Jungkernigen; zugenommen dagegen die neutrophilen Segmentkernigen, so daß die Kultur mit Actinomycin D im Kulturmedium gegenüber der Kontrolle mehr reife Zellen enthält. Nach 48 Stunden haben im Vergleich zur Kontrollkultur unter der Einwirkung von Actinomycin D die eosinophilen Myelozyten und eosinophilen Segmentkernigen sich relativ vermehrt. Vermindert ist die Zahl der Promyelozyten und der Segmentkernigen. Es resultiert eine geringe Rechtsverschiebung der Reifungskurve, bedingt durch eine Zunahme der neutrophilen Myelozyten und Abnahme der Promyelozyten, Stabkernigen

und neutrophilen Segmentkernigen; also sind die reifen Zellen weniger stark unter der Einwirkung von Actinomycin D vertreten als ohne Zusatz dieser Substanz. Die statistische Berechnung nach dem χ^2 -Verfahren ergibt zu allen drei Kulturzeiten statistisch hochsignifikante Unterschiede.

Fall 4/Tab. 4

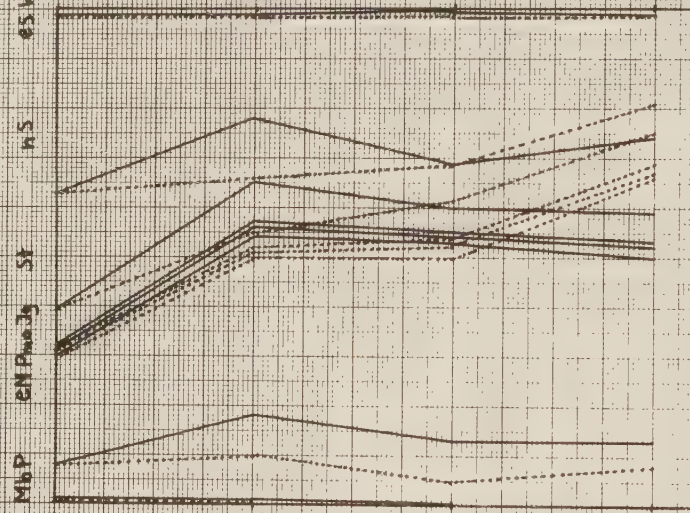
	24 h		48 h		72 h	
	K	C	K	C	K	C
Pe	23	6	0	0	0	0
bE	6	12	10	0	7	8
pE	201	62	98	103	71	118
oE	24	22	51	52	7	34
rE	165	168	129	376	237	354
	55,937 ⁺⁺		64,525 ⁺⁺		9,0807	
Mb	11	0	0	0	0	0
P	248	164	186	57	184	109
nM	538	641	597	557	511	760
eM	34	21	15	31	21	17
bM	0	12	0	0	1	0
Pmo	11	13	12	10	7	19
Jg	125	52	78	98	76	88
St	188	175	134	83	211	61
nS	320	519	468	401	372	236
eS	11	11	0	10	14	8
bS	0	0	0	0	0	0
Mo	0	0	0	0	0	9
	125,522 ⁺⁺		84,128 ⁺⁺		196,721 ⁺⁺	

	K	C
r MI	$\frac{3}{254}$	$\frac{1}{102}$
24 h		
w MI	$\frac{4}{967}$	$\frac{4}{903}$
24 h		
r MI	$\frac{0}{159}$	$\frac{0}{155}$
48 h		
w MI	$\frac{2}{888}$	$\frac{1}{753}$
48 h		
r MI	$\frac{1}{85}$	$\frac{0}{160}$
72 h		
w MI	$\frac{0}{800}$	$\frac{1}{993}$
72 h		

Fall 4 Abb. 4 Perniciöse Anämie

Granulopoese

6/E 3/3 0
H Pe bE pE dE rE
-MI% 16,1
M6P
ENPma3g
St
nS
65WMI% 13,2



Erythropoese

4,8 (9,7) 90 (90) 4,8 (90)

..... () + Cosmogen[®] 0,05 µg/ml

Kontrolle

Fall 5: M. Waldenström, Abb. 5, S. 41, Tab. 5, S. 40

1. Erythropoese

Nach 24 Stunden ist die Reifungskurve nach rechts verschoben, bedingt durch eine Zunahme der polychromatischen Erythroblasten, bei gleichzeitigem Abfall der oxyphilen und reifen Erythroblasten. Damit überwiegen die teilungsfähigen Zellen nach Actinomycin-D-Gabe in der Kultur die reifen Zellen. Nach 48 Stunden Kulturdauer dagegen ist eine Linksverschiebung der Reifungskurve eingetreten, indem die Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten auf Null abgenommen und die reifen Erythroblasten zugenommen haben. Die 72-Stundenkulturen sind nicht signifikant unterschiedlich, dagegen ist die differente Zusammensetzung der 24- und 48-Stundenkultur als hochsignifikant zu sichern.

2. Granulopoese

Nach 24 Stunden ist eine Linksverschiebung der Reifungskurve zu ermitteln; somit haben die unreifen Zellen unter Actinomycin D gegenüber der Kultur ohne diesen Zusatz abgenommen. Im einzelnen ist das zurückzuführen auf ein Absinken der Zahl der Promyelozyten und neutrophilen Myelozyten, bei einem Anstieg der Zahl der Stabkernigen und starken Anstieg der neutrophilen Segmentkernigen. Nach 48 Stunden dagegen ist eine Rechtsverschiebung der Reifungskurve festzustellen. Die neutrophilen Myelozyten haben zugenommen, dagegen sind die jugendlichen Stabkernigen und neutrophilen Segmentkernigen abgefallen. Nach 72 Stunden ist die Reifungskurve wiederum leicht nach links verschoben durch eine Abnahme der neutrophilen Segmentkernigen, bei einem Anstieg der Stabkernigen und eosinophilen Segmentkernigen. Damit überwiegen wieder die reifen Zellen. Zu allen drei Kulturzeiten lassen sich statistisch hochsignifikante Unterschiede in der Zusammensetzung der Kulturen mit und ohne Actinomycin D ermitteln.

Fall 5/Tab. 5

	24 h		48 h		72 h	
	K	C	K	C	K	C
Pe	0	0	0	1	0	0
bE	26	35	6	0	0	0
pE	43	164	7	32	9	73
oE	27	9	5	16	5	12
rE	139	190	46	243	49	176
	50,327 ⁺⁺		28,911 ⁺⁺		5,615	
Mb	0	0	0	1	0	0
P	182	173	151	245	85	222
nM	581	571	405	736	275	625
eM	88	78	33	73	22	63
bM	10	5	6	0	0	0
Pmo	17	26	13	40	13	22
Jg	44	69	79	42	44	94
St	43	130	104	57	31	118
nS	111	337	182	211	76	248
eS	35	52	6	56	5	73
bS	0	4	0	0	0	0
Mo	0	0	0	0	0	0
	133,719 ⁺⁺		136,167 ⁺⁺		30,584 ⁺⁺	

	K	C
r MI	$\frac{1}{96}$	$\frac{1}{208}$
24 h		

w MI	$\frac{3}{922}$	$\frac{5}{922}$
24 h		

r MI	$\frac{1}{18}$	$\frac{1}{49}$
48 h		

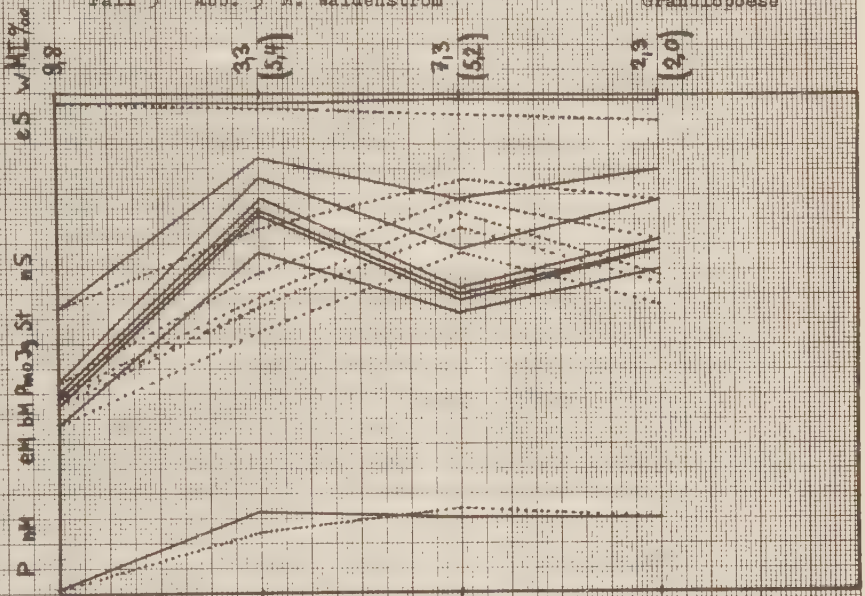
w MI	$\frac{5}{687}$	$\frac{6}{1164}$
48 h		

r MI	$\frac{1}{14}$	$\frac{0}{85}$
72 h		

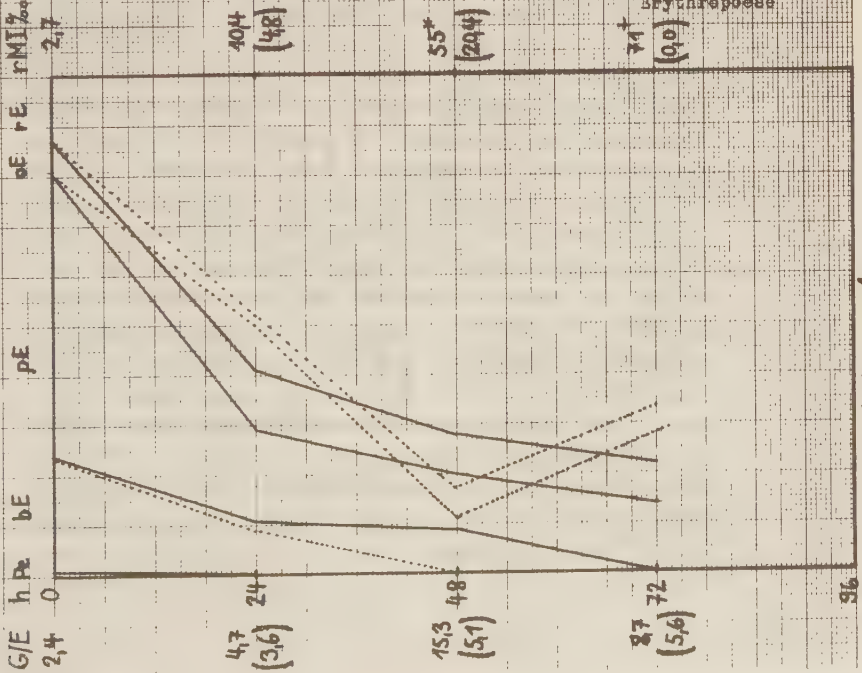
w MI	$\frac{1}{439}$	$\frac{2}{1026}$
72 h		

Fall 5 Abb. 5 M. Waldenström

Granulopoese



Erythropoese


 $\times \frac{1}{18} + \frac{1}{74}$

96

Fall 6: Nephrogene Anämie, Abb. 6, S. 44, Tab. 6, S. 43.

1. Erythropoese

Nach 24 Stunden ist eine deutliche Rechtsverschiebung der Reifungskurve eingetreten, indem die reifen Zellen relativ abgenommen haben. Vermindert sind die basophilen und reifen Erythroblasten, dagegen vermehrt die polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten. Nach 48 Stunden ist die Rechtsverschiebung gleich geblieben, obwohl die basophilen Erythroblasten angestiegen und die reifen Erythroblasten etwas abgefallen sind. Nach 72 Stunden ist der Grad der Rechtsverschiebung der Reifungskurve nur noch gering. In der Kultur mit Actinomycin D haben die basophilen Erythroblasten sich vermehrt und die oxyphilen Erythroblasten abgenommen, verglichen mit der Kultur ohne diesen Zusatz. Zu allen drei Kulturzeiten errechnen sich hochsignifikante Unterschiede.

2. Granulopoese

Nach 24 Stunden Bebrütung der Kultur besteht eine erhebliche Rechtsverschiebung der Reifungskurve, wobei die Zahl der neutrophilen und eosinophilen Myelozyten angestiegen, die der Promonozyten und neutrophilen Segmentkernigen abgefallen ist. Es hat damit unter der Einwirkung von Actinomycin D eine Zunahme der teilungsfähigen Zellen stattgefunden. Nach 48 Stunden dagegen besteht eine Linksverschiebung der Reifungskurve. Neben einer relativen Zunahme der neutrophilen Myelozyten und der neutrophilen Segmentkernigen erfolgt ein Abfall der Promyelozyten und der Jugendlichen. Nach 72 Stunden ist statt der Linksverschiebung eine Rechtsverschiebung eingetreten durch einen Anstieg der neutrophilen Myelozyten und Jugendlichen sowie durch einen Abfall der neutrophilen Segmentkernigen, eosinophilen Segmentkernigen und Monozyten, im Vergleich zur Kultur mit Actinomycin D und Kontrollkultur ohne Zusatz. Die Unterschiede zu allen Zeiten erweisen sich als statistisch hochsignifikant.

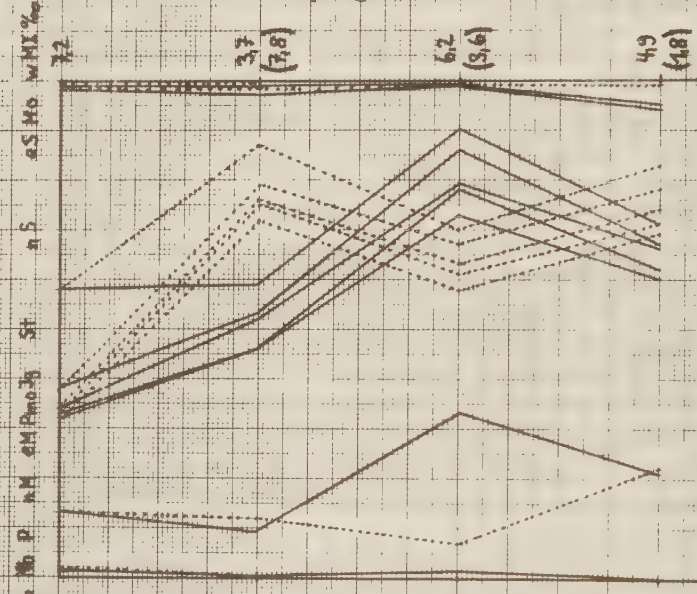
Fall 6/Tab. 6

	24 h		48 h		72 h	
	K	C	K	C	K	C
Pe	3	19	0	0	0	2
bE	39	58	9	5	5	33
pE	51	416	101	60	51	82
oE	30	135	37	19	26	21
rE	183	289	185	37	208	311
	114,617 ⁺⁺		22,675 ⁺⁺		17,427 ⁺⁺	
Mb	5	6	9	2	1	1
P	140	116	482	112	320	305
nM	557	583	592	851	598	671
eM	0	32	83	47	24	34
oM	0	0	0	0	0	0
Pmo	92	6	19	37	62	35
Jg	20	26	111	65	20	49
St	91	77	65	46	53	66
nS	563	122	129	478	364	264
eS	32	10	10	20	78	10
bS	0	0	0	0	0	0
Mo	10	0	0	3	14	0
	318,602 ⁺⁺		512,566 ⁺⁺		106,861 ⁺⁺	

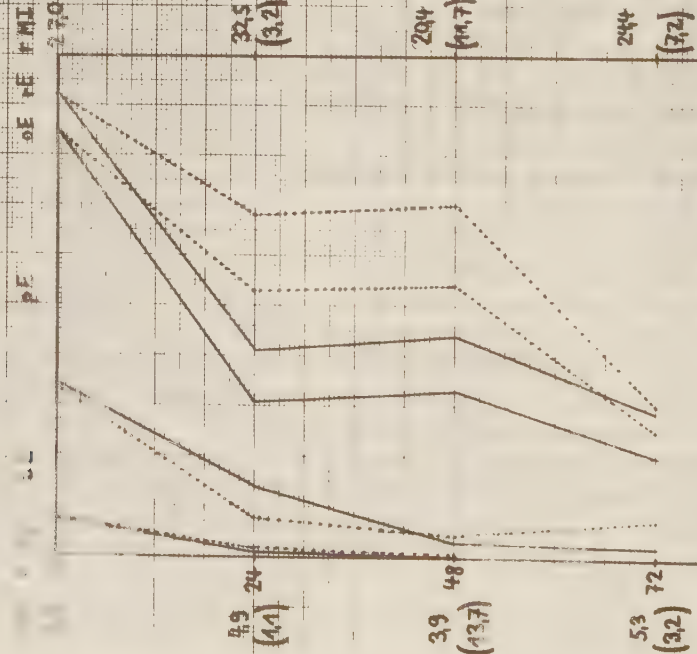
	K	C
r MI 24 h	$\frac{4}{123}$	$\frac{2}{628}$
w MI 24 h	$\frac{3}{814}$	$\frac{6}{769}$
r MI 48 h	$\frac{3}{147}$	$\frac{1}{84}$
w MI 48 h	$\frac{8}{1296}$	$\frac{4}{1114}$
r MI 72 h	$\frac{2}{82}$	$\frac{1}{138}$
w MI 72 h	$\frac{5}{1052}$	$\frac{2}{1095}$

Tabl. 6 Abb. 6 Nephrogene Anämie

Granulopoese



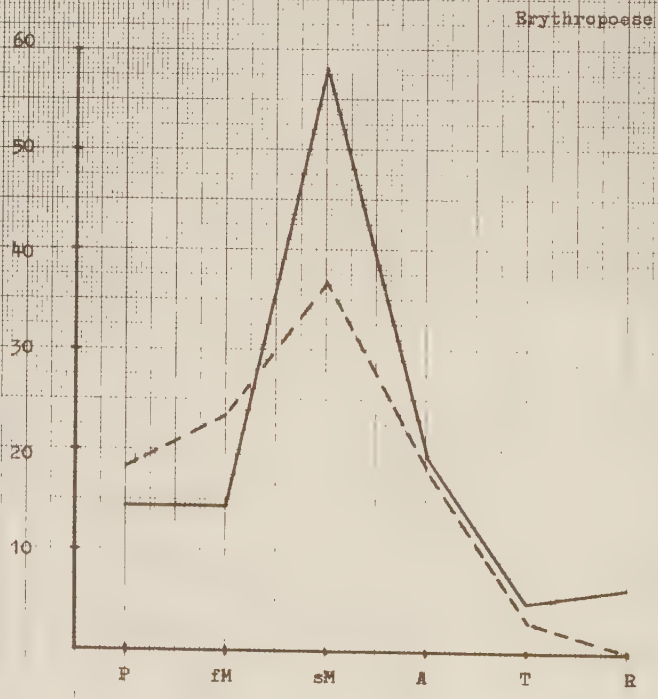
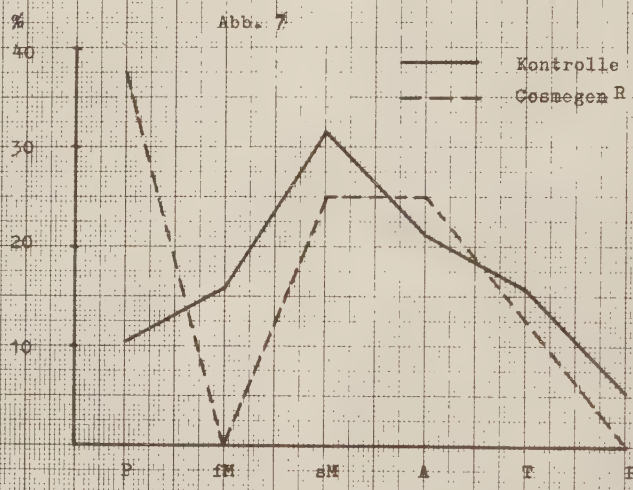
Erythropoese



Karyologische Kurven (Abb. 7, S. 46)

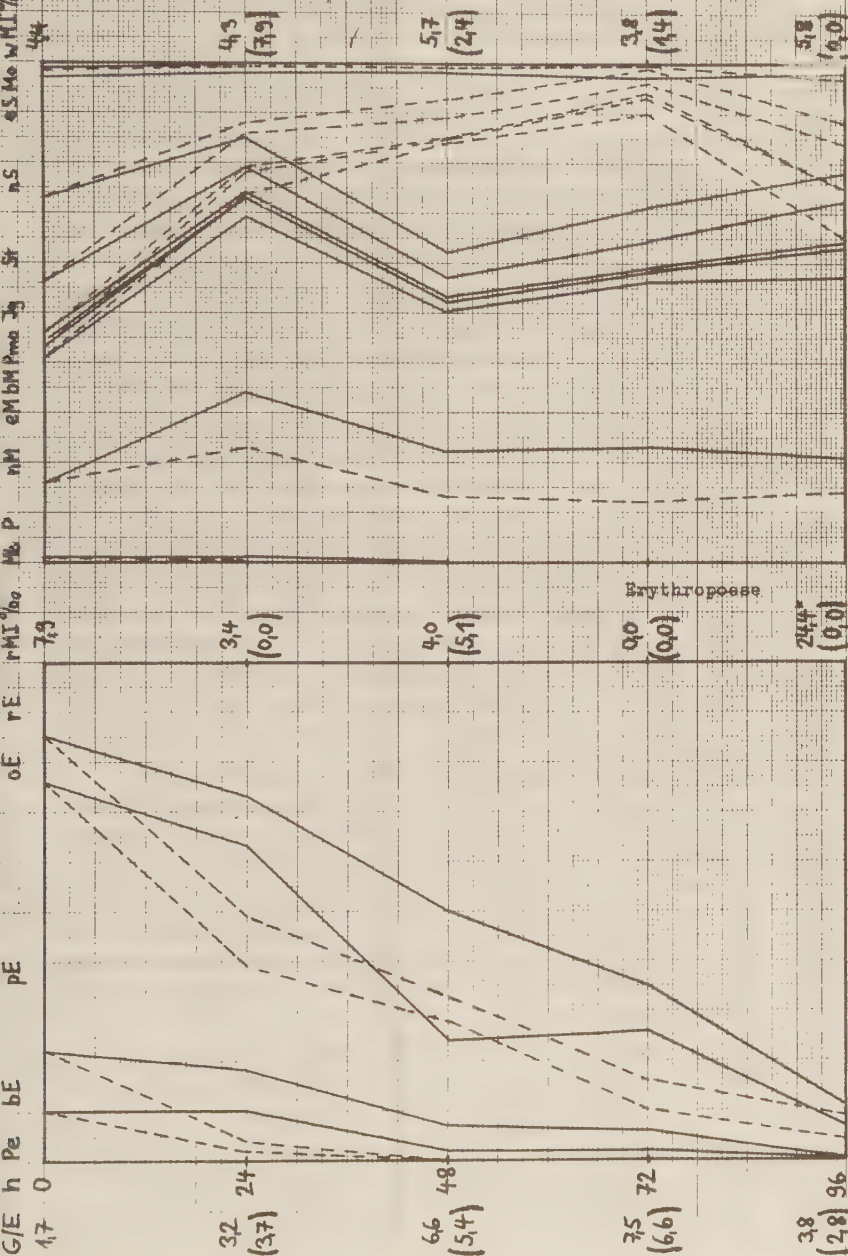
In der Erythropoese werden bei allen 6 Fällen zusammen in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz 8 Mitosen, in den Kontrollkulturen 19 Mitosen gezählt. In der Erythropoese wird die karyologische Kurve durch Actinomycin D als Zusatz zur Kultur zwar verändert, wegen der zu geringen Zahl von Mitosen muß diese Veränderung aber als zufällig angesehen werden.

In der Granulopoese werden bei allen 6 Fällen zusammen in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz 60 Mitosen, in den Kontrollkulturen 63 Mitosen gezählt. In der Granulopoese ist der größte Unterschied in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz gegenüber den Kontrollkulturen eine Abnahme der späten Metaphasen und Zunahme der Prophasen und frühen Metaphasen. Wegen der ungenügenden Anzahl von Mitosen ist nicht auszuschließen, daß diese Veränderungen unter den Einwirkung von Actinomycin D zufallsbedingt sind.



Fall 1-3 Abb. 8 0,5 g/ml Cosmegen^R

Granulopoese



41

Fall 1 - 3: Vereinigte Reifungskurven, 0,5 μ g/ml Actinomycin D, Abb. 8, S. 47

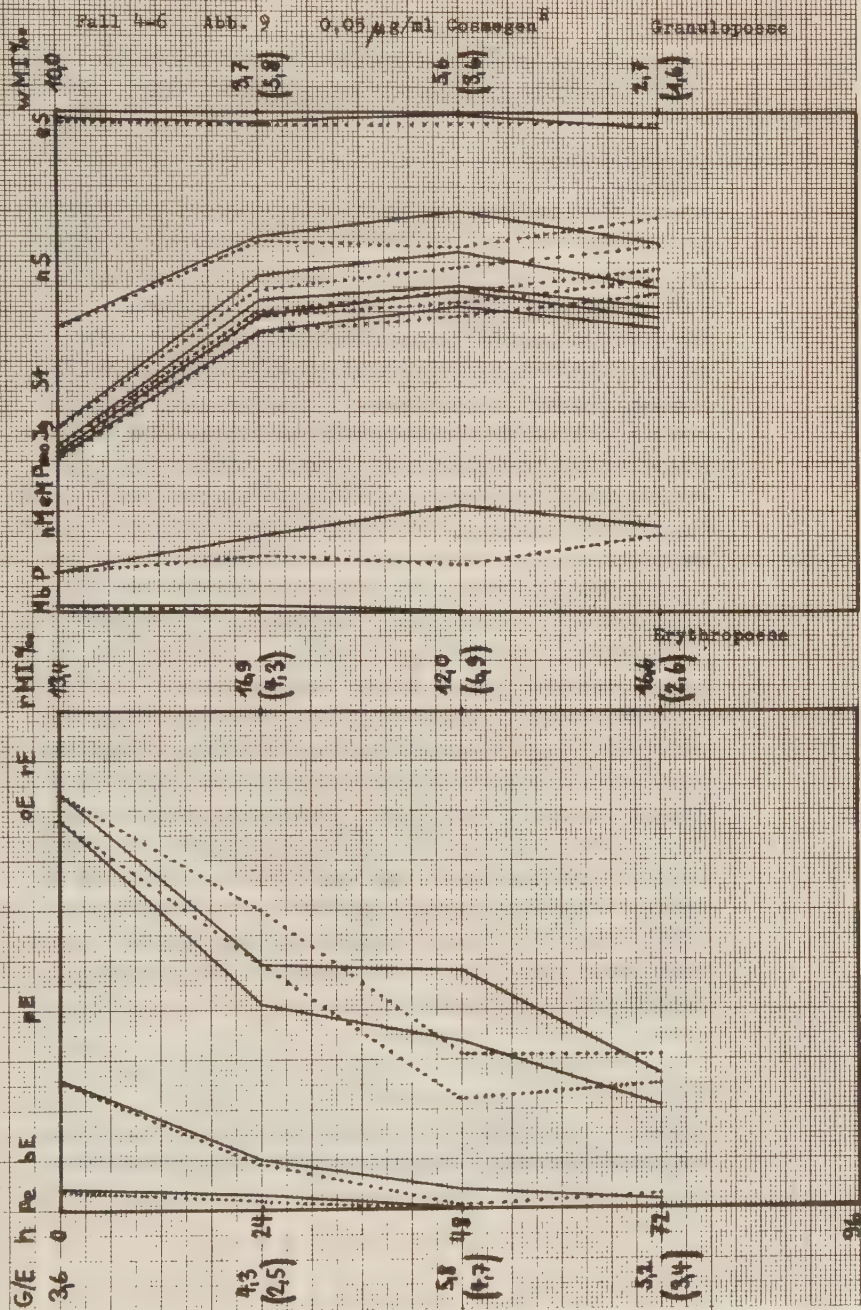
1. Erythropoese

Nach 24 Stunden ist es in den Kulturen mit Actinomycin D gegenüber der Kontrolle zu einer Abnahme der Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten gekommen; die Zahl der oxyphilen Erythroblasten bleibt etwa gleich, die der reifen Erythroblasten nimmt deutlich zu, wodurch die Reifungskurve nach links verschoben wird. Nach 48 Stunden ist unter Actinomycin D eine Abnahme der Proerythroblasten, basophilen und oxyphilen Erythroblasten bei gleichzeitigem Anstieg der polychromatischen und reifen Erythroblasten eingetreten. Die Zahl der unreifen Zellen ist damit in den Kulturen mit Actinomycin D geringer als in den Kontrollkulturen. Es resultiert also eine Linksverschiebung der Reifungskurve. Nach 72 Stunden zeigen sich die Proerythroblasten, basophilen, polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz gegenüber den Kontrollkulturen vermindert, die reifen Erythroblasten entsprechend vermehrt, womit die Reifungskurve wie nach 24 und 48 Stunden Kulturzeit wiederum nach links verschoben ist. Nach 96 Stunden kann wegen Zelldetritus nur der Fall 2 in der Kultur mit und ohne Actinomycin D ausgewertet werden. Wie auf Seite 27 genauer beschrieben, tritt dort ebenfalls eine Linksverschiebung der Reifungskurve auf. Der rote Mitoseindex ist bei den gemittelten Reifungskurven nach 24 Stunden in den Kulturen mit Actinomycin D geringer als in den Kontrollkulturen. Nach 48 und 72 Stunden erscheint wegen der geringen Zahl der Mitosen keine weitere Aussage möglich.

2. Granulopoese

In der Granulopoese ist es nach 24 Stunden Kulturzeit zu einem Anstieg der neutrophilen Myelozyten und Jugendlichen gekommen, die eosinophilen Myelozyten bleiben etwa gleich, während die Myeloblasten, Promyelozyten, Promonozyten, Stabkernigen, neutrophilen und eosinophilen Segmentkernigen sowie Monozyten in den Kulturen mit Zusatz des Zytostatikums gegenüber den Kontrollen abfallen. Insgesamt erhöht sich bei Zugabe von Actinomycin D die Zahl der teilungsfähigen Zellen gegenüber der Kontrolle. Die Reifungskurven sind nach rechts verschoben und etwas gespreizt. Nach 48 Stunden steigen in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz verglichen mit den Kontrollkulturen die neutrophilen Myelozyten und Jugendlichen an, die Myeloblasten, Promyelozyten, eosinophilen Myelozyten, Promonozyten, Stabkernigen, neutrophilen und eosinophilen Segmentkernigen sowie Monozyten fallen deutlich ab. In den Kulturen mit Actinomycin D finden sich deutlich mehr teilungsfähige Zellen als in denen ohne Zusatz des Zytostatikums. Die Reifungskurven sind deutlich nach rechts verschoben und gespreizt. Nach 72stündiger Kulturzeit zeigen unter Einwirkung des Zytostatikums die Myeloblasten, Promyelozyten, Promonozyten, Jugendlichen, Stabkernigen, die neutrophilen und eosinophilen Segmentkernigen sowie Monozyten einen Abfall, verglichen mit den Kulturen ohne Actinomycin D. Die Zahl der teilungsfähigen Zellen ist beim Vorhandensein von Actinomycin D gegenüber den Kontrollkulturen erhöht, die Reifungskurven noch stärker nach rechts verschoben und gespreizt. Nach 96 Stunden ist nur der Fall 2 auswertbar, dabei nimmt wie auf S. 27 beschrieben die Rechtsverschiebung und Spreizung der Reifungskurven ab, ist aber immer noch deutlich vorhanden. Der weiße Mitoseindex zeigt nach 24 Stunden einen Anstieg,

nach 48 und 72 Stunden dagegen ein Absinken in den Präparaten mit Zusatz von Actinomycin D im Vergleich zu denen ohne Zusatz. Der G/E-Index weist nach 24 Stunden in den Kulturen mit Zusatz des Zytostatikums einen höheren, nach 48 und 72 Stunden einen niedrigeren Wert gegenüber den 3 Kontrollkulturen auf.



Fall 4-6: Vereinigte Reifungskurven, 0,05 μ g/ml Actinomycin D, Abb. 9, S. 51.

1. Erythropoese

In der Erythropoese ist es nach 24 Stunden Kulturzeit in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz zu einem Abfall der Proerythroblasten, basophilen und reifen Erythroblasten gekommen, wohingegen die polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten ansteigen, verglichen mit den Kontrollkulturen. Dadurch überwiegen die teilungsfähigen Zellen nach Zusatz des Zytostatikums, und die Reifungskurve ist nach rechts verschoben. Nach 48-stündiger Einwirkungszeit des Zytostatikums stellt man einen Anstieg der Proerythroblasten und reifen Erythroblasten fest, die basophilen, polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten fallen hingegen ab. Die teilungsfähigen Zellen sind bei Anwesenheit des Zytostatikums leicht gegenüber der Kontrolle vermindert; dadurch wird die Reifungskurve nach links verschoben. Nach einer Kulturzeit von 72 Stunden hat eine Vermehrung der Proerythroblasten, basophilen und polychromatischen Erythroblasten stattgefunden; die oxyphilen Erythroblasten sind fast gleich geblieben und die reifen Erythroblasten unter den Einwirkung des Zytostatikums abgefallen. Dadurch werden weniger teilungsfähige Zellen in den Kulturen, die der Einwirkung von Actinomycin D ausgesetzt waren, gefunden. Der rote Mitoseindex zeigt zu allen 3 untersuchten Kulturzeiten einen deutlichen Abfall in den Kulturen mit Actinomycin D gegenüber den Kontrollkulturen.

2. Granulopoese

In der Granulopoese ist es nach 24 Stunden Kulturzeit bei Vorhandensein des Zytostatikums zu einem Abfall der Myeloblasten, Promyelozyten, Promonozyten, Jugend-

lichen und Monozyten gekommen, die eosinophilen Myelozyten, neutrophilen und eosinophilen Segmentkernigen bleiben etwa gleich, die neutrophilen Myelozyten und Stabkernigen zeigen einen Anstieg unter der Einwirkung des Antibiotikums, verglichen mit den Kontrollkulturen. Insgesamt ist das Verhältnis teilungsfähiger zu nicht teilungsfähigen Zellen in etwa gleich geblieben. Nach 48-stündiger Einwirkung von Actinomycin D weisen die Kulturen mit Actinomycin D einen Abfall der Myeloblasten, Promyelozyten, Jugendlichen und Stabkernigen auf, die eosinophilen Myelozyten, Promonozyten, neutrophilen und eosinophilen Segmentkernigen sowie Monozyten sind angestiegen. Außerdem hat sich die Zahl der teilungsfähigen Zellen unter der Einwirkung von Actinomycin D im Vergleich zu den Kulturen ohne Einwirkung des Zytostatikums nur unwesentlich verändert, die Reifungskurven sind aber etwas gespreizt. Nach 72 Stunden Kulturzeit kann wegen der zu geringen Zahl auszählbarer Myeloblasten keine Aussage über die Wirkung von Actinomycin D auf diese Zellart erfolgen. Die Promyelozyten, Promonozyten, Stabkernigen, neutrophilen und eosinophilen Segmentkernigen sowie Monozyten zeigen einen Abfall unter dem Einfluß des Antibiotikums, die neutrophilen, eosinophilen sowie Jugendlichen hingegen, verglichen mit der Kontrolle, einen Anstieg. Die Zahl der teilungsfähigen Zellen ist unter der Einwirkung von Actinomycin D deutlich angestiegen. Die Reifungskurven sind gespreizt und nach rechts verschoben. Der weiße Mitoseindex erhöht sich nach 24 Stunden unter der Einwirkung von Actinomycin D und erniedrigt sich nach 48 und 72 Stunden. Der G/E-Index fällt zu allen 3 untersuchten Zeiten in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz verglichen mit der Kontrolle ab.

Diskussion

Actinomycin D hat sich in der klinischen Anwendung beim Menschen in der Konzentration von ca. 0,015 mg/kg gegenüber einer Reihe von Malignomen als zytostatisch wirksam erwiesen. Bei über der Hälfte der Patienten trat allerdings als unerwünschte Nebenwirkung eine Veränderung des Blutbildes auf, deren Ursache eine Beeinflussung des Knochenmarks durch das Zytostatikum sein dürfte. Durch eine Konzentration von 10 µg/ml Actinomycin D erhielt Torelli (43) am menschlichen Knochenmark nach Inkubation von 30 bis 120 Minuten, gemessen am verminderten Einbau von radioaktiv markiertem Cytidin, Uridin und Leucin, einen deutlich hemmenden Effekt. Beim Actinomycin C (46) ist unter den gleichen Versuchsbedingungen wie bei unserer Arbeit bei der Konzentration von 1,0 µg/ml bereits ein stark zytotoxischer Effekt festzustellen. Wir wählten deswegen eine niedrigere Konzentration, nämlich 0,5 µg/ml Actinomycin D. Unsere Konzentration liegt damit immer noch über 30 mal höher als die einmalige Gabe bei der klinischen Anwendung.

Bei 3 Versuchsserien zeigte sich ein deutlich hemmender Effekt auf die Erythro- und Granulopoese, ohne daß eine zu große zytotoxische Wirkung die Auswertung verhindert hätte. Bei weiteren 3 Versuchsserien senkten wir die Konzentration um 1/10 auf 0,05 µg/ml Actinomycin D, um festzustellen, ob jetzt auch noch eine Beeinflussung der Knochenmarkszellen festzustellen und in wie weit eine Konzentrationsabhängigkeit dabei vorhanden ist.

Erythropoese

In der Erythropoese ist bei der niedrigeren Konzentration von 0,05 µg/ml Actinomycin D bei allen 3 Versuchsserien eine Erniedrigung des roten Mitoseindex vorhanden, die bei Fall 6 nach 24 Stunden Kulturdauer sogar statistisch hochsignifikant ist. Die Reifungskurven

verhalten sich unterschiedlich. Sie sind bei der perniziösen Anämie (Fall 4) nach links, bei der renalen Anämie (Fall 6) nach rechts verschoben; beim Morbus Waldenström (Fall 5) sind sie nicht deutlich verändert. Die G/E-Indices sind bei allen 3 Fällen abgesunken, was bedeutet, daß Actinomycin D in dieser Konzentration zum Überwiegen der Erythropoese in den Kulturen führt.

Bei der höheren Konzentration von 0,5 µg/ml Actinomycin D nehmen bei allen 3 Versuchsserien die Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten, also jene Zellen, die für die Zellmultiplikation von besonderer Bedeutung sind, deutlich und statistisch hochsignifikant ab. Die übrigen Zellen der roten Reihe, polychromatische, oxyphile und reife Erythroblasten verhalten sich von Fall zu Fall unterschiedlich. Der G/E-Index nimmt in zwei Kulturserien ab, in einer Kulturserie dagegen zu. Einheitlich ist ebenfalls eine deutliche Abnahme des roten Mitoseindex vorhanden, wofür allerdings keine statistische Signifikanz zu errechnen ist.

Morphologische Zeichen, die für die zytotoxische Wirkung von Actinomycin D bei den Konzentrationen 0,05 und 0,5 µg/ml sprechen, wie z. B. Vakuolenbildung und Kernsegmentation sind in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz weder bei den Retikulumzellen, noch bei den Zellen der Erythropoese zu beobachten. Vermehrtes Auftreten von Zelldetritus ist ebenfalls nicht festzustellen.

Beim Vergleich der Wirkung von Actinomycin D und Actinomycin C (46) auf die Erythropoese des menschlichen Knochenmarks fällt auf, daß Actinomycin C in der Konzentration von 0,01, 0,04 und 0,08 µg/ml ebenfalls eine Abnahme der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten hervorruft, wie sie bei der Konzentration von 0,5 µg/ml Actinomycin D nachweisbar ist. Für eine Entkernungsstörung liegt beim Actinomycin D im Gegensatz zum Actinomycin C kein Hinweis vor. Beide Zytostatika führen zu einer Abnahme des roten Mitoseindex.

Torelli (43) untersuchte am menschlichen Knochenmark die Wirkung von Actinomycin D auf die DNS-, RNS- und Proteinsynthese mit Hilfe der Autoradiographie am Einbau von radioaktiv markiertem Cytidin, Uridin und Leucin. Actinomycin D hemmt nach dieser Untersuchung die DNS-, RNS- und Proteinsynthese bei allen Reifungsstufen der Erythropoese, am stärksten bei den unreifen Zellen, den Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten. So entspricht die Methode der DNS-, RNS- und Proteinmarkierung in ihren Ergebnissen ganz den unseren nach Differential- und Mitosezählung.

Am Knochenmark der Maus fand Scaro (39) durch Actinomycin D eine Hemmung der Differenzierung von Stammzellen in erythroblastische Vorstufen. Erst wenn die Actinomycin-D-Wirkung abgeklungen war, kam es zur erneuten Bildung von unreifen Erythroblasten. Reissmann (36) erhielt auch bei Versuchen am Knochenmark der Maus durch Actinomycin D eine verminderte Differenzierung von Stammzellen in Erythroblasten. Als wahrscheinliche Ursache für die gehemmte Differenzierung von Stammzellen zu Erythroblasten führt er die Blockierung der RNS-Synthese durch das Zytostatikum an, da die Differenzierung der Knochenmarkzellen von der RNS-Synthese abhängig sein soll. Nicht ausschließen kann Reissmann eine Abtötung der Stammzellen durch das Zytostatikum. Dadurch würde die Zahl der zur Differenzierung bereitstehenden Stammzellen vermindert und derselbe Effekt erreicht werden. Am Knochenmark des Kaninchens fanden Becker und Hershko (2, 22) unter der Einwirkung von Actinomycin D eine Abnahme der unreifen Zellen. Die Erythropoese war durch eine hohe Konzentration des Zytostatikums völlig zu hemmen. So entsprechen die in-vivo-Ergebnisse am Versuchstier den in vitro am menschlichen Knochenmark von Torelli und uns erhobenen Befunden.

Nach Berücksichtigung der zum Teil auch in der Einleitung aufgeführten Literatur könnte theoretisch die in der Erythropoese durch die Konzentration $0,5 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D verursachte deutliche Abnahme der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten durch folgende in früheren Experimenten gefundenen Eigenschaften des Actinomycin D bedingt sein:

1. Durch die Zytotoxizität des Actinomycin D:
 - a) Durch Abtötung werden die zur Differenzierung bereitstehenden Stammzellen vermindert.
 - b) Abtötung von Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten.
2. Durch den unterschiedlich starken Eingriff in die Mitosehäufigkeit der verschiedenen Reifungsstufen: Die polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten müssten sich relativ häufiger als die Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten teilen.
 - a) Hemmung der Mitose bei den Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten.
 - b) Anregung der Mitose bei den polychromatischen und oxyphilen Erythroblasten.
3. Durch den Eingriff in die Differenzierung (Ausreifung):
 - a) Differenzierung von Stammzellen in Proerythroblasten ist gehemmt.
 - b) Durch Reifungsförderung werden die Reifungsstufen der Proerythroblasten und der basophilen Erythroblasten relativ schneller durchlaufen als die der übrigen Erythropoese, wodurch die basophilen Zellen abnehmen.

Die verminderte Regeneration der Erythropoese ist bei unseren Versuchen durch den Abfall des roten Mitoseindex sichergestellt. Im Verlauf des Differenzierungsprozesses von den Retikulumzellen zum polychromatischen Erythroblasten werden die basophilen Vorstufen durchlaufen.

Die Basophilie der Zellen entsteht aber durch die RNS-Synthese, welche durch Actinomycin D gehemmt wird, woraus ein verlangsamtes Durchlaufen der basophilen Vorstufen resultieren würde. Somit erfolgt bei den basophilen Zellen der Zufluß aus den Stammzellen langsamer als der Abfluß zu den reifen Zellen der Erythropoese, wodurch die Proerythroblasten und die basophilen Erythroblasten abnehmen. Deswegen müßte am Abnehmen der basophilen Zellen unter der Einwirkung von Actinomycin D eine Reifungshemmung wesentlich beteiligt sein.

Granulopoese

In der Granulopoese ist bei der niedrigeren Konzentration von 0,05 µg/ml Actinomycin D nach 48 Stunden bei allen 3 Versuchsreihen eine geringe Vermehrung der neutrophilen Myelozyten hauptsächlich auf Kosten der Promyelozyten eingetreten (Abb. 9, S. 48). Zwei Fälle zeigen diese Vermehrung der neutrophilen Myelozyten auch nach 24 und 72 Stunden Kulturdauer. Bei einem Fall (Fall 5) dagegen sind nach 24 und 72 Stunden die neutrophilen Myelozyten vermindert. Der G/E-Index ist bei allen 3 Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz abgesunken. Der weiße Mitoseindex steigt bei allen 3 Fällen nach 24 Stunden etwas an, um nach 48 und 72 Stunden wieder abzufallen. Eine statistische Signifikanz ist dafür aber nicht zu errechnen.

Bei der höheren Konzentration von 0,5 µg/ml Actinomycin D (Abb. 8, S. 47) ist bei allen 3 Versuchsserien nach 24, 48 und 72 Stunden eine deutliche Zunahme der neutrophilen

Myelozyten festzustellen, wobei aber das Verhältnis der unreifen, teilungsfähigen Zellen zu reifen, nicht teilungsfähigen Zellen fast noch wie bei den Kontrollen ist. Nach 48 und 72 Stunden ist die Reifungskurve dann deutlich gespreizt und nach rechts verschoben. Die Ursache ist eine sehr starke Zunahme der neutrophilen Myelozyten, wobei außer den nicht mehr teilungsfähigen Zellen der Granulopoese auch die jüngeren teilungsfähigen Zellen der Granulopoese vermindert sind. Der G/E-Index nimmt in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz einmal zu, zweimal dagegen ab. Der weiße Mitoseindex steigt bei allen drei Fällen nach 24 Stunden Kulturzeit deutlich an, um nach 48 und 72 Stunden genauso deutlich abzufallen. Diese Veränderung des weißen Mitoseindex ist aber nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Wie in der Erythropoese sind auch in der Granulopoese keine morphologischen Hinweise für einen zytotoxischen Effekt von Actinomycin D in den beiden untersuchten Konzentrationen von 0,05 und 0,5 $\mu\text{g/ml}$ zu finden.

In der Literatur wird die Wirkung von Actinomycin D auf die weiße Reihe des Knochenmarks nicht einheitlich dargestellt. Torelli (43) findet am menschlichen Knochenmark durch Actinomycin D im Prinzip die ~~selbe~~ biochemische Wirkung wie auf die Erythropoese; je unreifer die Zelle ist, um so ausgeprägter ist die Hemmung der DNS-, RNS- und Proteinsynthese, am stärksten also im Myeloblasten, am schwächsten im Segmentkernigen. Neu (30) erhält bei menschlichen, mit Phytohämagglutinin stimulierten Blutleukozyten eine vollständige Verhinderung der Mitose, wenn die Actinomycin-D-Konzentration im Kulturmedium mehr als 0,02 $\mu\text{g/ml}$ beträgt. Cooper (10) konnte in menschlichen Lymphozyten durch 10 $\mu\text{g/ml}$ die Proteinsynthese vollständig unterdrücken. Hershko und Schwarz (21) beschreiben beim Kaninchen nach einmaliger Injektion des Zytostatikums und einer

damit erreichten Konzentration von $0,1 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D bei der anschließend durchgeführten Knochenmarkuntersuchung in der Granulopoese eine Abnahme der unreifen, teilungsfähigen Zellen. Demgegenüber erhält Reissmann (36) bei Mäusen, die bis zu 21 Tagen einer Actinomycin D-Konzentration von $5 \mu\text{g/ml}$ ausgesetzt waren, ein ganz anderes, dem unseren ähnliches Ergebnis. Die Myeloblasten sind unverändert, die Promyelozyten stiegen stark und leicht die neutrophilen Myelozyten an. Stark sind die Metamyelozyten, deutlich die Stabkernigen vermindert. Insgesamt sind die unreifen, teilungsfähigen Zellen vermehrt. Reissmann fand ferner, daß die Zahl der Mitosen in der Granulopoese auf das Doppelte erhöht, die Leukozyten im Blut auf das 3- bis 4fache angestiegen, und durch Injektion von Typhusendotoxin eine uneingeschränkte Stimulierbarkeit der Granulopoese zu erreichen war. Die Entzündung wird beim Meerschweinchen gebremst (32).

Bei der klinischen Anwendung von Actinomycin D beim Menschen wird als Nebenwirkung auf die Granulopoese sowohl ein Leukozytenanstieg als auch ein Leukozytenabfall beobachtet. Einem Leukozytenanstieg kann auch ein Leukozytenabfall folgen (11, 21, 40).

Actinomycin D greift auch in den Mitoseablauf ein, und es kommt bei HeLa-Zellen (27) zu einer Verlängerung der Prophasen, bei Fibroblasten von Hühnern und Ratten (1) zu einer Verlängerung der späten Metaphasen sowie zur verhinderten Trennung der Tochterzellen in der Telophase.

Die Einwirkung von Actinomycin C (46) auf menschliches Knochenmark führt bei der Konzentration $0,04$ und $0,08 \mu\text{g/ml}$ in der Granulopoese zu einer Zunahme aller unreifen, teilungsfähigen Zellen. Da außerdem zu allen Kulturzeiten eine Verminderung der Mitosehäufigkeit vorliegt, wird die Zunahme der unreifen, teilungsfähigen

gen Zellen durch Actinomycin C bei Verminderung des G/E-Indexes auf eine Reifungshemmung zurückgeführt. Somit bewirkt Actinomycin C in der Granulopoese eine Hemmung der Regeneration und der Reifung, wodurch die gesamte Proliferation gehemmt wird.

Die Mitosehäufigkeit steigt bei unseren Versuchen entsprechend Reissmann (36) in den Kulturen mit Actinomycin D als Zusatz in der Granulopoese erst an, fällt aber schon am zweiten Tag unter den Kontrollwert, wobei dieser Effekt bei der höheren Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ stärker ausgeprägt ist als bei der niedrigeren Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$. Diesem unterschiedlichen Verhalten des Mitoseindexes nach 24 bzw. 48 und 72 Stunden liegt entweder eine zeitlich unterschiedliche Beeinflussung der Mitosehäufigkeit oder der Mitosedauer zugrunde, wobei die Mitosehäufigkeit erst zu- und dann abnimmt, bzw. die Mitosedauer erst verlängert und dann verkürzt wird. Für eine grundsätzlich vorhandene Beeinflussung des Mitoseablaufs durch Actinomycin D spricht zwar die Änderung der Mitosephasenverteilung (Abb. 7, S. 46), denn es fällt in den Kulturen mit Zusatz des Zytostatikums eine Vermehrung der Prophasen und frühen Metaphasen bei einer Verminderung der späten Metaphasen auf. Die den karyologischen Kurven zugrunde liegende Zahl der Mitosen ist aber nicht hoch genug, um die Zufallsbedingtheit dieses Ergebnisses mit genügend hoher Sicherheit auszuschließen. Außerdem waren zum Zeitpunkt des erhöhten Mitoseindexes nach 24 Stunden die frühen Teilungsphasen gerade nicht vermehrt. Weil die Zellzusammensetzung in der Granulopoese den Schwankungen des weißen Mitoseindexes - Anstieg nach 24 Stunden sowie Abfall nach 48 und 72 Stunden - aber nicht folgt, sondern sich kontinuierlich mit zunehmender Kulturzeit immer stärker von den Kontrollen unterscheidet, wird im Gegensatz zur Erythropoese, bei der eine Regenerationshemmung vorliegt, die Regeneration

in der Granulopoese wahrscheinlich nicht wesentlich durch Actinomycin D beeinflusst.

Die gefundenen Veränderungen der Zellzusammensetzung in der Granulopoese sind durch eine Reifungshemmung an zwei Stellen zu erklären: Zum einen beim Durchlaufen der basophilen Vorstufen durch Hemmung der RNS-Synthese, wofür die Verminderung der Myeloblasten und der Promyelozyten bei der Konzentration von $0,5 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D spricht, zum anderen beim Übergang vom neutrophilen Myelozyten zum Jugendlichen, denn die neutrophilen Myelozyten vermehren sich in den Kulturen mit $0,05 \mu\text{g/ml}$ Actinomycin D leicht, mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ als Zusatz stark.

Actinomycin D bewirkt mit den untersuchten Konzentrationen von $0,05$ und $0,5 \mu\text{g/ml}$ in der Granulopoese weder einen stärkeren zytotoxischen Effekt, noch eine deutliche Beeinflussung der Regeneration. Weil das Zytostatikum die gesamte Proliferation der Erythropoese hemmt und dabei eine Erniedrigung des G/E-Indexes bewirkt, ist nicht nur aus den Reifungskurven auf die Reifungshemmung der Granulopoese zu schließen.

Zusammenfassung

Um die Wirkung von Actinomycin D auf die Proliferation von menschlichem Knochenmark in vitro zu untersuchen, wurde das durch Sternalpunktion gewonnene Knochenmark von 6 Patienten in zwei verschiedenen Kulturserien angesetzt. Zur einen Serie wurde zu dem Knochenmark von 3 Patienten 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D, zur anderen zum Knochenmark von 3 Patienten 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D zugesetzt. Kulturen ohne Zusatz dienten als Kontrolle.

Nach 24, 48, 72 und, soweit technisch möglich, nach 96 Stunden Kulturdauer wurde ein Teil der Kulturen entnommen und durch Anfertigung sowie Auszählen von Knochenmarkausstrichen die Zusammensetzung der Zellarten und Mitosen in ihren Phasen bestimmt. Daraus wurden die Parameter Mitoseindex, G/E-Index, Reifungs- und karyologische Kurven zusammengestellt. Die Reifungskurven und Mitoseindices wurden auf Signifikanz berechnet.

In der Erythropoese ist bei der Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D die Zellzusammensetzung noch nicht deutlich verändert. Bei der Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D kommt es einheitlich zu einer statistisch hochsignifikanten Abnahme der Proerythroblasten und basophilen Erythroblasten, wobei eine Reifungshemmung beim Durchlaufen der basophilen Vorstufen in der Erythropoese für diesen Effekt die wahrscheinliche Ursache ist. Bei beiden untersuchten Konzentrationen des Zytostatikums kommt es in allen 6 Kulturserien zu einer deutlichen Abnahme des roten Mitoseindex, welche einmal bei der Konzentration 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D nach 24 Kulturdauer statistisch hochsignifikant unterschiedlich ist. Somit bewirkt Actinomycin D in der Erythropoese auch eine Hemmung der Regeneration. Morphologische Hinweise für eine zytotoxische Wirkung von Actinomycin D auf die Erythropoese wurden nicht beobachtet.

In der Granulopoese ist bei der niedrigen Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D kaum eine Wirkung festzustellen. Es kommt nur zu einer leichten Vermehrung der neutrophilen Myelozyten. Bei der höheren Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Actinomycin D ist einerseits die Vermehrung der neutrophilen Myelozyten stark ausgeprägt und hochsignifikant, andererseits nehmen wie in der Erythropoese auch in der Granulopoese die basophilen Vorstufen (Myeloblast und Promyelozyt) unter der Einwirkung des Zytostatikums ab. Es liegen in der Granulopoese keine morphologischen Anzeichen für die Zytotoxizität des Actinomycin D vor. Somit kann bei gesicherter Hemmung der Proliferation der Erythropoese und Erniedrigung des G/E-Indexes durch Actinomycin D eine starke Reifungshemmung in der Granulopoese nachgewiesen werden.

Von der Wirkung des Actinomycin C (46) auf menschliches Knochenmark in vitro unterscheidet sich die hier beobachtete von Actinomycin D in der Beeinflussung der Granulopoese. Beide Zytostatika bewirken eine Reifungshemmung, aber beim Actinomycin D werden andere Reifungsstufen als beim Actinomycin C gehemmt. Beim Actinomycin C ist zu allen untersuchten Kulturzeiten die Regeneration nachweislich vermindert, wohingegen Actinomycin D diese bei unseren Versuchsbedingungen nicht sicher beeinflusst. Der Effekt auf die Erythropoese ist bei beiden Zytostatika im Prinzip gleich.

Literaturverzeichnis

1. Bassleer, R. und Goessens, G.
Étude Cytologique et Cytochimique des Effets
de l'Actinomycine D sur des Fibroblastes de
Poulet ou de Rat, Cultivés in vitro.
Europ. J. Cancer 6, Pergamon Press 1970
2. Becker, HJ. und Straschil, F.
Makrozytose und semieffektive Erythropoese bei
experimenteller hämolytischer Anämie.
13. Tagg. Dt. Ges. Hämat., Ulm 1968, Seite 6
3. Bernengo, M. G., Pegoraro, L.
Deoxycytidilate deaminase, deoxycytidine kinase
and thymidine kinase activities of human lympho-
cytes following phytohaemagglutinin stimulation.
13. Int. Hämat. Kgr., München 1970, Abst. Vol.
Seite 204
4. Boll, I. und Fuchs, G.
Vereinfachtes Verfahren zur kurzfristigen Kul-
tivierung von menschlichem Knochenmark in vitro.
Blut VII, 257 (1961)
5. Boll, I. und Mersch, G.
Morphologische Untersuchungen zur Proliferations-
kinetik der normalen und pathologischen Erythro-
poese in vitro.
Blut XVII, 193 (1968)
6. Boll, I.
Granulocytopoese unter physiologischen und
pathologischen Bedingungen
Springer-Verlag (1966)
Heidelberg - New York - Berlin

7. Boll, I. und Fuchs, G.
 Unterschiedliche Strahlenwirkung auf die Erythro- und Leukopoese in vitro.
 Verhandlungen des 8. Kongresses der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie, 339, Wien 1961

8. Braun, H.
 Tierexperimentelle Befunde zur Strahlensensibilisierung bei örtlichen und Ganzkörperbestrahlungen.
 Dt. Rö.-Kgr., Düsseldorf 1971, S. 44

9. Cleffmann, G.
 Bildung zusätzlicher DNS nach Blockierung der Zellteilung von tetrahymena durch Actinomycin.
 Z. Zellforsch. 70, 290 (1966)

10. Cooper, H. L.
 Control of Synthesis and Wastage of Ribosomal RNA in Lymphocytes.
 Nature 227, 1105 (1970)

11. Eckler, E., Gasser, Ch., Württenberger, H. Willich, E.
 Zur Behandlung von Wilmstumoren
 Z. für Kinderchirurgie 4, 183 (1967)

12. Epifanova, O. I., Lomakina, K. Y., Smolenskaya, I. N. and Sevatiynova, M. V.
 Differential sensitivity during the cell cycle to Puromycin and Actinomycin D as studies in cultures synchronized with specific inhibitors of DNA synthesis.
 2. Meeting of the Europ. Study Group for cell Proliferation. Reimsburg 1968, Seite 12

13. Fisher, R. A. and F. Yates
 Statistical Tables
 Oliver and Boyd, 1963

14. Frankfurt, O. S.
Effect of hydrocortisone, adrenalin and actinomycin D on transition of cells to the DNA synthesis phase.
Exper. Cell Res. 52, 220 (1968)
15. Gallien-Lartigue, O. and Goldwasser, E.
The effect of specific inhibitors on hemoglobin synthesis.
Biochim. Biophys. Acta 103, 319 (1965)
16. Giger, K.
Wirkung von Actinomycin D auf die Erythropoetinbildung während Hypoxie bei der Ratte.
Klin. Wschr. 46, 42 (1968)
17. Goessens, G. et Bassleer, R.
Étude cytologique et cytochimique de la réversibilité des effets de l'Actinomycine D dans des fibroblastes cultivés in vitro.
Arch. Biol. (Liège) 81, 165 (1970)
18. Goodman, H. M.
Metabolic effects of Actinomycin in rats.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 126, 821 (1967)
19. Hamann, W.; Oehlert, W. und Hedderich, M.
Inkorporation und Elimination von Actinomycin D-³H durch verschiedene Zellarten in vitro.
Virchows Archv. 1, 120 (1968)
20. Hamann, W.
Autoradiographic investigations on the mechanism of action of Actinomycin D.
2nd Meeting of the Europ. Study Group for Cell Proliferation. Schloß Reinsburg, 1968,
Seite 34

21. Hershko, Ch., Schwartz, R. und Izak, G.
 The effect of erythropoetin on rabbit bone marrow response to actinomycin.
 Abstr. Vol. Seite 10. Intern. Hämat. Kgr., München 1970

22. Hershko, Ch., Schwartz, R., and Izak, G.
 Morphological-biochemical Correlations in Rabbit red cell precursors synchronized by Actinomycin administration
 Brit. J. Haemat., 17, 569, (1969)

23. Hay, J. E.
 Effect of Actinomycin of Protein synthesis by Lymphocytes.
 Nature, 215, 77 (1967)

24. Lasnitzki, I.
 The effect of actinomycin D and methylcholanthrene on prostatic epithelium in vitro.
 Europ. Tiss. Cult. Soc. London (1968)

25. Lasnitzki, I.
 The effects of Actinomycin D and Methylcholanthrene on the Cytology and RNA and Protein Synthesis in Prostatic Epithelium grown in vitro.
 Cancer Res. 29, 318 (1969)

26. Leone, L. A., Colbert, M. P., York, C. L.
 Prolonged intravenous infusion chemotherapy of advanced cancer. 1. Combined therapy with Nitrogen mustard + Actinomycin D, Thiotepa + Actinomycin D, and Thiotepa + Actinomycin P₂⁵.
 Cancer Chemotherapy Repts. No. 15, 21 (1961)

27. Lewis, J. H. Gore, A. T. Hertig, D. A. Goss
 Treatment of trophoblastic disease.
 Am. J. Obst. and Gynec. 96, 710 (1966)

28. Mittermayer, Ch.
Der mitotische Zyklus und seine Beeinflussung
durch Zytostatika.
Dt. Krebsskongr., Berlin 1968, S. 40
29. Necheles, T. F.
Hemoglobin synthesis and normoblast maturation.
J. Clin. Invest. 45, 1051 (1966)
30. Neu, R. L., J. C. Leão and L. I. Gardner
Effects of Actinomycin D and Puromycin on
chromosomes of cultured human leucocytes.
Nature 211, 881 (1966)
31. Mitschke, R., H. Reinwein, K. Musshoff, R. Nicole
Behandlung von Wilmstumoren.
Dt. Rö.-Kor., Teil B, 214 (1967)
32. Pick, E., J. Krejci, J. L. Turk
Release of Skin Reactive Factor from Guinea-
pig Lymphocytes by Mitogens
Nature 225, 236 (1970)
33. Pileri, A., R. Bernadelli, L. Brusa
Changes in protein metabolism in proliferating
and non-proliferating human acute leucaemia
cells treated with actinomycin D.
Experientia 25, 862 (1969)
34. Rabes, H. und B. Jantsch
Kombination von Kurzinkubation und Langzeit-
kultur beim Cytostatica-Test menschlicher
Tumorzellen.
Z. Krebsforsch. 74, 295 (1970)

35. Rabinowitz, Y. and A. Dietz
Genetic control of lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozymes in culture of lymphocytes and granulocytes: Effect of addition of phytohaemagglutinin, actinomycin D or puromycin.
Biochim. Biophys. Acta 139, 254 (1967)
36. Reissmann, K. R. and K. Ito
Selective Eradication of Erythropoiesis by Actinomycin D as the result of interference with hormonally controlled effector pathway of cell differentiation.
Blood, 28, 201 (1966)
37. Ringertz, N.R., Z. Darzynkiewicz and L. Bolund
Actinomycin binding Properties of stimulated human lymphocytes.
Exper. Cell Res. 56, 411 (1969)
38. Rothstein, H., J. Fortin and D. Sonneborn
Inhibition of DNA synthesis and cell division by Actinomycin D
Experientia 22, 5, 294 (1966)
39. Scaro, J. L.
Suppression of erythropoiesis by actinomycin D in normal and erythropoietin treated mice.
Acta physiol. lat.-amer. 17, 88 (1967)
40. Sharp and Dohme GmbH
Lyovac - Cosmegen
8 München 80, Leuchtenberggring 20
41. Skutelsky, E. and D. Danon
Comparative study of nuclear expulsion from the late erythroblast and cytokinesis.
Exper. Cell Res. 60, 427 (1970)

42. Soeiro, R. and H. Amos
Arrested protein synthesis in polysomes of
cultured chick embryo cells.
Science 154, 3759 (1966)
43. Torelli, U., G. Grossi, T. Artusi, G. Emilia, I. R. Attiya
and C. Mauri
RNA and protein metabolism in normal human
erythroblasts and granuloblasts.
Acta haemat. 32, 271 (1964)
44. Torelli, U., G. Grossi, T. Artusi, G. Emilia, I. R.
Attiya and C. Mauri
RNA turnover rates in normal peripheral mono-
nuclear leucocytes.
Exper. Cell Res. 36, 502 (1964)
45. Trepel, F., J. Rastetter, H. Theml und G. Stock-
husen
Nukleinsäuresynthese und Zytostatikawirkung
in pathologischen Lymphknotenzellen.
Med. Klin. 61, 618 (1966)
46. Ventzke, H.
Die Wirkung von Actinomycin C auf die Proli-
feration von menschlichem Knochenmark in
vitro.
Diss. -Berlin 1971

Frau Professor Dr. med. I. Boll danke ich für die Überlassung des Themas und ihre unermüdliche Hilfe bei der Auswertung meiner Untersuchungen.

Herrn Professor Dr. H. J. Belitz danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Berechnung der Versuchsergebnisse.

Studie im Rahmen der Assoziation Haematologie
EURATOM - GSF, Nr. 031-64-1 BIAD.

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft unterstützt.

LEBENS LAUF

Geboren am 13. 2. 1944 in Jüterbog/Brandenburg.

Von 1950 bis 1954 Besuch der Volksschule Bockhorn/
Lüneburger Heide.

Von 1954 bis 1960 Besuch der Mittelschule Walsrode/
Lüneburger Heide.

Von 1960 bis 1964 Besuch des Gymnasiums Walsrode,
1964 Abitur.

April 1964 bis April 1966 Bundeswehr

April 1966 bis 1967 Studium der Chemie an der
Universität Hamburg.

1967 bis 1973 Studium der Humanmedizin in Berlin.
Dort ärztliche Vorprüfung im Sommer 1969 und ärzt-
liche Prüfung im Winter 1972/73.

